



Universitat de Lleida

**PREMIS A TREBALLS DE RECERCA DE LA UdL**  
per a l'estudiantat de batxillerat i cicles formatius de grau superior

**Estudi de plagues en cultius agrícoles amb l'ajut de la  
biologia molecular**

**Èlia Martínez Estela**

Centre: Institut Ronda de Lleida

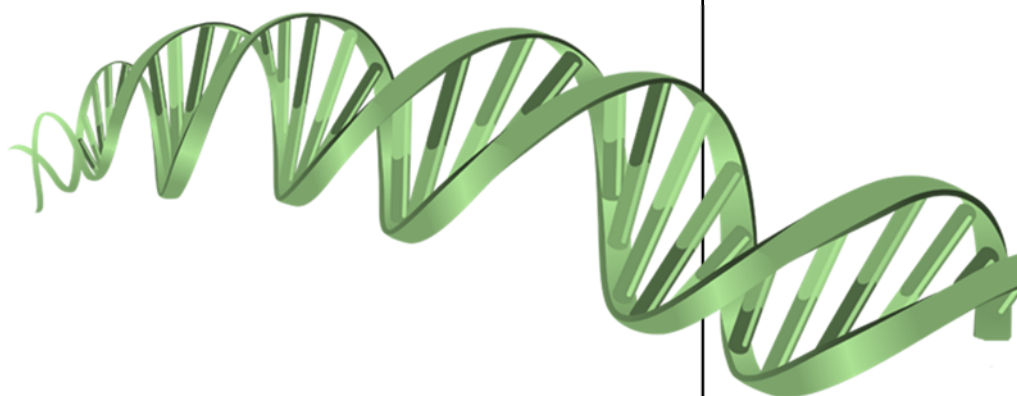
Tutora: Esther Ros Fuixench

Tutora Itinera: Pilar Muñoz Odina i Alexandre Levi

Data: novembre, 2020

Treball de Recerca

# ESTUDI DE PLAGUES EN CULTIUS AGRÍCOLES AMB L'AJUT DE LA BIOLOGIA MOLECULAR



Setembre de 2019





## Abstract

At present, biological control of pests in agricultural crops requires specific tools for the detection and identification of natural enemies and their level of parasitism in insects that cause plague. For this reason, it is necessary to develop specific molecular markers that unequivocally identify if a pest insect is parasited and, in this way, if it can be controlled naturally. The present research work deals with the identification by molecular techniques of *Hypera postica* Gyllenhal. This is an insect that affects alfalfa and causes great economic losses due to the action of the larvae, which devour the leaves, losing yield and quality of the forage. One of the main natural enemies are other hymenoptera insects (*Bathyplectes* sp.), which parasitize *H. postica* larvae. A first step in identifying whether *H. postica* larvae are parasitized or not by *Bathyplectes* sp. is the identification, through molecular techniques, of a genetic sequence that is present in the genome of *H. postica* and not in *Bathyplectes* sp. This identification has been the objective of the experimental part of the present work. For that, sampling of insects in alfalfa fields in different zones of the Ebro Valley; a controlled breeding of *H. postica*; extractions and quantifications of DNA, PCR with specific primers; and electrophoresis in agarose gel were carried out. The results showed the amplification of the genetic sequence for *H. postica* and not for *Bathyplectes* sp., which is a first milestone in the molecular identification of the parasitism of these hymenoptera in *H. postica*.

## Resum

Actualment, el control biològic de plagues en cultius agrícoles requereix eines específiques per a la detecció i identificació d'enemics naturals i del seu nivell de parasitoidisme en insectes que causen plaga. Per això, es fa necessari desenvolupar marcadors moleculars específics que identifiquin inequívocament si un insecte plaga està parasitat i, d'aquesta manera, pot ser controlat de forma natural. El present treball de recerca tracta sobre la identificació mitjançant tècniques moleculars d'*Hypera postica* Gyllenhal. Aquest insecte és un curculiònid que afecta l'alfals i causa grans pèrdues econòmiques per l'acció de les larves, que devoren les fulles, perden rendiment i qualitat del farratge. Un dels principals enemics naturals són altres insectes himenòpters (*Bathyplectes* sp.), que parasiten les larves d'*H. postica*. Un primer pas per a conèixer si les larves d'*H. postica* estan parasitades o no per *Bathyplectes* sp. és la identificació, mitjançant tècniques moleculars, d'una seqüència genètica que estigui present en el genoma d'*H. postica* i no en el de *Bathyplectes* sp. Aquesta identificació ha estat l'objectiu de la part experimental del present treball. Per això, es van dur a terme captures d'insectes en camps d'alfals de diferents zones de la Vall de l'Ebre; una cria controlada d'*H. postica*; extraccions i quantificacions d'ADN; PCR amb encebadors específics i electroforesi en gel d'agarosa. Els resultats van mostrar l'amplificació de la seqüència genètica per *H. postica* i no per *Bathyplectes* sp., la qual cosa suposa una primera fita en la identificació molecular del parasitoidisme d'aquests himenòpters en *H. postica*.

## Resumen

Actualmente, el control biológico de plagas en cultivos agrícolas requiere herramientas específicas para la detección e identificación de enemigos naturales y de su nivel de parasitismo en insectos que causan plaga. Por ello, se hace necesario desarrollar marcadores moleculares específicos que identifiquen inequívocamente si un insecto plaga está parasitado y, de este modo, puede ser controlado de forma natural. El presente trabajo de investigación trata sobre la identificación mediante técnicas moleculares de *Hypera postica* Gyllenhal. Este insecto es un curculiónido que afecta la alfalfa y causa grandes pérdidas económicas por la acción de las larvas, que devoran las hojas, perdiendo rendimiento y calidad del forraje. Uno de los principales enemigos naturales son otros insectos himenópteros (*Bathyplectes* sp.), que parasitan las larvas de *H. postica*. Un primer paso para conocer si las larvas de *H. postica* están parasitadas o no por *Bathyplectes* sp. es la identificación, mediante técnicas moleculares, de una secuencia genética que esté presente en el genoma de *H. postica* y no en el de *Bathyplectes* sp. Esta identificación ha sido el objetivo de la parte experimental del presente trabajo. Por ello, se llevaron a cabo capturas de insectos en campos de alfalfa de diferentes zonas del Valle del Ebro; una cría controlada de *H. postica*; extracciones y cuantificaciones de ADN; PCR con cebadores específicos y electroforesis en gel de agarosa. Los resultados mostraron la amplificación de la secuencia genética para *H. postica* y no por *Bathyplectes* sp., lo que supone un primer hito en la identificación molecular del parasitismo de estos himenópteros en *H. postica*.

## **Agraïments**

### **Motivació**

Durant el 1er curs de Batxillerat, una de les matèries que més em va agradar va ser la Biologia. Els temes estudiats que més em van cridar l'atenció van ser els relacionats amb l'expressió del missatge genètic i les tècniques relacionades amb el seu estudi: els àcids nucleics, l'enginyeria genètica, la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), els encebadors i, sobre tot, l'aplicació a la vida real d'aquests conceptes i tècniques. Així, quan em vaig assabentar de la possibilitat de fer el TdR a través del Projecte Itinera sobre l'estudi d'insectes mitjançant tècniques de Biologia Molecular, vaig veure l'oportunitat de poder aplicar aquells coneixements que més m'havien cridat l'atenció en un cas pràctic de la vida real, com el que es tracta en aquest treball.

Per altra banda, al veure que la recerca tractava amb insectes, em va fer recordar que quan era més petita m'agradava molt capturar insectes i posar-los en pots per observar-los. Fins i tot, en unes colònies d'estiu em van arribar a donar un diploma com la millor caçadora d'insectes. Així, l'estudi d'insectes, ara des d'un altre punt de vista molt diferent i amb tècniques molt avançades, és un altre aspecte que em va motivar per fer aquesta recerca.

# ÍNDEX

Abstract .....	1
Resum .....	2
Resumen .....	3
Agraïments .....	4
Motivació .....	4
1. INTRODUCCIÓ GENERAL .....	8
2. HIPÒTESI .....	11
3. OBJECTIUS .....	11
PART TEÒRICA .....	12
1. EL CULTIU DE L'ALFALS I PRINCIPALS PLAGUES QUE L'AFECTEN .....	12
1.1. Introducció .....	12
1.2. Principals aspectes productius de l'alfals .....	12
1.2.1. Característiques del cultiu .....	12
1.2.2. Sembra, desenvolupament i aprofitament del cultiu .....	13
1.3. Principals plagues de l'alfals .....	15
1.3.1. Plagues i danys que produeixen .....	15
1.3.1.1. Pugons (Hemíptera) .....	16
1.3.1.2. <i>Apion pisi</i> F (Coleòptera) .....	17
1.3.1.3. <i>Sitona</i> spp. (Coleòptera) .....	18
1.3.1.4. <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidòptera) .....	18
1.3.2. <i>Hypera postica</i> (Coleòptera): Descripció biològica de l'insecte .....	19
1.3.3. <i>Hypera postica</i> : Parasitoidisme .....	22
2. IDENTIFICACIÓ MOLECULAR D'INSECTES .....	23
2.1. Introducció .....	23
2.2. Tècniques d'identificació molecular d'organismes .....	24
2.2.1. Extracció d'ADN .....	24
2.2.2. Quantificació de l'ADN extret .....	26
2.2.3. Amplificació per PCR d'un gen .....	27
2.2.4. Electroforesi .....	29
2.3. Aplicacions de la identificació molecular d'insectes en el control de plagues .....	31
PART EXPERIMENTAL .....	32
1. Introducció del cas pràctic .....	32
2. Hipòtesi .....	33



3.	Materials i mètodes .....	33
3.1.	Materials .....	33
3.2.	Mètodes .....	35
3.2.1.	Mostreig d'insectes al camp.....	36
3.2.2.	Cria d' <i>Hypera postica</i> .....	37
3.2.2.1.	Cria massiva.....	38
3.2.2.2.	Cria individualitzada .....	39
3.2.3.	Identificació molecular.....	40
3.2.3.1.	Extracció d'ADN dels insectes estudiats.....	40
3.2.3.2.	Quantificació de l'ADN extret.....	44
3.2.3.3.	Amplificació d'un gen per PCR .....	45
3.2.3.4.	Electroforesi en gel d'agarosa .....	48
3.2.4.	Entrevista a un expert del sector productiu de l'alfals .....	52
4.	Resultats i Discussió .....	53
4.1.	Cria individualitzada d' <i>Hypera postica</i> .....	53
4.2.	Extracció i quantificació d'ADN .....	57
4.3.	Amplificació amb l'encebador EF-1 $\alpha$ .....	58
4.4.	Visió del sector productiu de l'alfals .....	60
5.	Conclusions .....	61
5.1.	Científiques.....	61
5.2.	Personals .....	62
5.3.	Continuació de les línies de recerca .....	62
6.	Bibliografia .....	64
	ANNEX .....	68
	Entrevista al Sr. Antonio Sopena – Enginyer Agrònom de NAFOSA (Esplús, Osca). .....	68



## 1. INTRODUCCIÓ GENERAL

En l'agricultura, el terme "**plaga**" es refereix als animals, plantes i microorganismes que tenen un efecte negatiu sobre la producció agrícola, provocant danys que poden ser econòmics, o de salut en els animals i en les persones que consumeixen els aliments derivats (CIPF, 2005). Les plagues es veuen afavorides si hi ha una font concentrada d'aliment, com és el cas de grans superfícies de terra dedicades al mateix cultiu. Això, crea un ambient idoni pel seu desenvolupament.

Des de l'època dels Sumeris (4500 a. C.), ja es té constància de que l'home tractava de fer front als insectes mitjançant productes naturals, com el sofre. Més tard, els xinesos van fer insecticides a partir de plantes verinoses. També van tractar d'ajustar els períodes de sembra, per desfasar els cultius del cicle de vida de les plagues (Ureta et al., 2014). Amb la revolució agrícola dels segles XVII i XVIII, el problema de les plagues es va agreujar, ja que es van crear superfícies de monocultiu. Al segle XIX es va iniciar l'ús comercial dels **plaguicides químics** (Figura 1), que es van expandir de manera important a mitjans del segle XX, quan es va popularitzar l'ús de productes com el DDT, el lindà i els herbicides. Amb el temps, l'alta toxicitat i persistència d'aquests productes a l'ambient van causar una gran alarma i es va restringir el seu ús, buscant alternatives menys tòxiques i/o més naturals, com el control biològic i el control integrat de plagues.



Figura 1. Aplicació de plaguicida químic en un cultiu extensiu. Avui dia es busquen alternatives menys tòxiques per al control de plagues. (Font foto: <http://carnewtdc.ie>).

L'objectiu d'aquests mètodes no és eradicar les plagues, sinó controlar-les per sota del llindar de danys econòmics. El **control biològic** és un mètode que utilitza enemics naturals (depredadors o paràsits) per a reduir els nivells de població dels organismes

plaga (Waage et al., 1988 a Ureta et al., 2014). Aquest mètode és diferent al control natural ja que és induït per l'home, amb la introducció artificial de poblacions dels enemics naturals a la plaga a combatre. El control biològic és un component important del **control o maneig integrat**, que es basa en l'ús de pràctiques que causin el menor dany possible a les persones i al medi ambient. El mètode consisteix, principalment, en eliminar les plagues minimitzant el seu accés a l'aliment, refugis i en el control per depredadors naturals.

Poc a poc, un major coneixement de la biologia dels agents patògens i dels seus enemics naturals pot portar a un control més eficient i sostenible de les plagues. Aquí, la **Biologia Molecular** pot jugar un paper molt important (Álvarez et al., 2005). Per exemple, les eines moleculars poden ajudar a identificar enemics naturals de les plagues, i a saber si un organisme està parasitat per un enemic natural que pot ajudar al seu control biològic. D'aquesta manera es podrien evitar o reduir els tractaments amb pesticides químics.

Un exemple de cultiu de gran valor econòmic, però en el que algunes plagues causen danys importants, és l'**alfals** (*Medicago Sativa* L.). Es tracta d'una lleguminosa que s'utilitza com a planta farratgera per al ramat. La seva importància rau en que és una de les principals fonts natural de proteïnes i, també, és rica en fibra, vitamines i minerals. A més, les arrels de l'alfals fixen nitrogen atmosfèric en el sòl, que és utilitzat tant per la pròpia planta com per altres cultius (Lloveras et al., 2018).

Espanya és una de las principals productores d'alfals d'Europa. En concret, l'any 2017 a Espanya es van conrear 266.000 ha d'alfals, de les quals gairebé la meitat (125.000, 47%) van ser a Aragó i Catalunya, sent les províncies d'Osca i Lleida les principals productores d'aquestes comunitats autònomes (65.500 ha) (MAPA, 2019). Actualment, és un cultiu estratègic, ja que aproximadament el 75% de la producció s'exporta a més de 30 països (Serenó, 2016).

Hi ha diverses plagues que afecten a l'alfals i causen danys que poden ser importants (Almacellas i Perdiguier, 2007). Una d'aquestes és un coleòpter curculiònid anomenat *Hypera postica* Gyllenhal (*abans Phytonomus variabilis* Herbst.), també conegut com la cuca verda de l'alfals, ja que la larva és d'aquest color. Aquesta larva pot mesurar 1 cm. Tant les larves com els adults s'alimenten del fullatge de l'alfals (Figura 2). Poden causar pèrdues molt importants en el primer tall, que van del 15 fins al 80 % de la producció (Sopena, 2019).



Figura 2. Adult i larva de cuca verda de l'alfals. (Font fotos: ukrbin.com, invasive.org).

L'ús de pesticides per controlar aquestes plagues s'ha anat restringint a causa de la toxicitat dels productes. Com alternativa, alguns investigadors han arribat a la conclusió de que és possible el control de la major part de les plagues mitjançant enemics naturals (Núñez et al., 2008). En el cas de la cuca verda no hi ha cap mètode de control biològic disponible, encara que hi ha alguns parasitoides que fan un control biològic natural d'aquesta plaga (Martín et al., 2019). Aquest és el cas dels himenòpters *Bathyplectes* spp., parasitoides de la cuca verda, però que de moment no són suficients per a un control adequat de la plaga. Així, un major coneixement d'aquest parasitoidisme pot servir per a augmentar l'eficàcia del control biològic en un futur pròxim.

Un pas en l'estudi d'aquest parasitoidisme és la identificació inequívoca d'insectes *H. postica* respecte als individus que puguin estar parasitats per *Bathyplectes* sp. Morfològicament, i en l'estat de larves, aquesta diferenciació no és possible, ja que les larves de *Bathyplectes* sp. devoren internament les larves d'*H. postica* fins als últims estadis. Una alternativa és la identificació mitjançant tècniques moleculars. En aquest sentit, encara que hi ha algun estudi filogenètic que ha diferenciat diferents soques d'*H. postica* mitjançant tècniques moleculars (Achata et al., 2013), la diferenciació respecte *Bathyplectes* sp. no s'ha estudiat.

A partir d'aquí, sorgeix la següent pregunta de recerca, que es tractarà de respondre en el present treball:

- És possible identificar inequívocament larves d'*Hypera postica* respecte de *Bathyplectes* sp. mitjançant tècniques moleculars com a primer pas per conèixer el nivell de parasitoidisme que pot tenir aquesta plaga?

## 2. HIPÒTESI

Donat que cada vegada està més restringit l'ús de pesticides en el control de plagues, i per al cas concret de la cuca verda de l'alfal ( *Hypera postica* Gyllenhal), es vol comprovar que la utilització d'eines de biologia molecular permet diferenciar entre *H. postica* i *Bathyplectes* sp. (parasitoide d'*H. postica*), com a pas previ al coneixement del grau de control de la plaga que poden exercir aquests parasitoides en camps d'alfals.

## 3. OBJECTIUS

D'acord a la hipòtesi plantejada, l'objectiu general d'aquest treball és detectar, mitjançant tècniques moleculars, un gen d'interès que permeti diferenciar *Hypera postica* de *Bathyplectes* sp. Per això, els objectius específics que es plantegen són:

- a) Conèixer, a nivell general, quins són els principals aspectes productius de l'alfal i les plagues que l'afecten.
- b) Revisar els mètodes per a la identificació molecular d'insectes.
- c) Aprendre les tècniques moleculars en un cas pràctic.
- d) Conèixer el procés i portar a terme la cria en cambra de cultiu de *H. postica* amb la finalitat de disposar d'individus d'*Hypera* no parasitats.
- e) A partir d'una seqüència genètica seleccionada, detectar si la regió escollida del gen d'interès és útil per diferenciar *H. postica* de *Bathyplectes* sp. mitjançant l'aplicació de tècniques d'extracció i amplificació d'ADN.

El treball es divideix en dues parts; una part teòrica i una part experimental. En la part teòrica s'exposen diferents conceptes, tan agronòmics, els quals parlen de l'alfal i de les seves principals plagues; com moleculars, relacionats amb tècniques d'identificació de seqüències de gens concrets. En la part experimental, s'exposen els diferents materials i mètodes utilitzats en la pràctica, per tal de poder arribar als resultats que ens portaran a qüestionar la hipòtesi prèviament formulada. Com complement a l'estudi, també es va fer una entrevista a un expert en el cultiu de l'alfal i de les plagues que l'afecten.

## PART TEÒRICA

### 1. EL CULTIU DE L'ALFALS I PRINCIPALS PLAGUES QUE L'AFECTEN

#### 1.1. Introducció

Com s'ha esmentat en la introducció general, l'alfals és un cultiu estratègic a la Vall de l'Ebre, tant per la superfície conreada com pel gran valor econòmic que genera. Així mateix, s'ha identificat que hi ha plagues, com la cuca verda (*H. postica*) que poden causar danys importants, i que es necessitaria millorar el seu control mitjançant mètodes integrats i control biològic.

En aquesta part del treball de recerca es revisen els principals aspectes productius de l'alfals, per a un millor coneixement de les seves característiques, cicle del cultiu, aprofitaments i principals plagues que l'afecten. Entre aquestes plagues és descriu en detall la biologia de l'insecte *H. postica* i el seu parasitoidisme per *Bachyplectes sp.*

#### 1.2. Principals aspectes productius de l'alfals

##### 1.2.1. Característiques del cultiu

L'alfals (*Medicago sativa* L) és una planta herbàcia perenne que pertany a la família de les Fabàcies o lleguminoses, que s'utilitza com a farratge. Té una alçada d'entre 40 i 90 cm. Les seves tiges són primes, erectes i molt consistents, el que afavoreix la seva sega. Les flors són blavoses o porpres (Figura 3). El sistema d'arrels consisteix en una arrel pivotant, que pot penetrar fins a 5 metres de fondària. El fruit és una beina doblegada en espiral, que usualment conté d'una a vuit llavors petites de forma arronyonada (1,5 a 2,5 mm).



Figura 3. Planta i camp d'alfals. (Font foto: [www.agrositio.com.ar](http://www.agrositio.com.ar)).



És un farratge conreat a tot el món (Europa i Estats Units principalment). Les condicions òptimes de temperatura per a la germinació de les llavors són de 2-3 °C, mentre que la seva temperatura òptima de creixement és de 28-30 °C. En les condicions climàtiques de la Vall de l'Ebre és un cultiu de regadiu, amb grans requeriments d'aigua. Per exemple, per assolir produccions mitjanes de 18.000 kg/ha es necessiten uns 6.000 m<sup>3</sup>/ha. Prefereix sòls profunds, permeables i de baixa salinitat, amb pH òptim de 7,5.

L'alfals és, possiblement, la planta farratgera amb major aplicació en la producció animal (Delgado et al., 2005). És molt complet des del punt de vista nutritiu per l'alimentació dels remugants. Es caracteritza per l'alt contingut en proteïna bruta. Aquesta proteïna és altament soluble, així que es pot fer servir també en l'alimentació de monogàstrics. L'alfals és una excel·lent font de minerals i vitamines. Una ració sobre la base d'alfals satisfaria plenament les necessitats nutritives del bestiar en minerals.

Un altre avantatge, molt important, del cultiu d'alfals ve donat per la seva alta capacitat de fixació de nitrogen atmosfèric, de fins 460 kg/ha (Delgado et al., 2015). Això és degut a la simbiosi (relació entre organismes en la qual els dos es beneficien) que es produeix a les arrels de la planta amb uns microorganismes (*Rhizobiums*) que són capaços de transformar el nitrogen atmosfèric o mineral en orgànic facilitant, així, la seva utilització per la resta dels éssers



vius. Aquests microorganismes fixen el nitrogen atmosfèric per al seu propi creixement i després l'alfals ho assimila.

**Figura 4. Nòduls produïts per *Rhizobiums* a les arrels d'una planta d'alfals. (Font foto: fineartamerica.com).**

També, quan s'aixeca el cultiu, el nitrogen queda en forma de nòduls a les arrels que es descomponen al sòl, podent-se aprofitar pels cultius següents (Figura 4).

### **1.2.2. Sembra, desenvolupament i aprofitament del cultiu**

Les èpoques de sembra de l'alfals són la primavera i la tardor. L'ús de varietats adaptades a la zona de cultiu és molt important per al desenvolupament i la productivitat de l'alfals. A la Vall de l'Ebre la varietat més comunament utilitzada és 'Aragó' (Delgado et al., 2005). La sembra se sol fer amb una sembradora de cereals, ja



que la llavor és molt petita i la sembra ha de ser molt superficial. La densitat de sembra és de 35-40 kg/ha (Figura 5).



Figura 5. Llavors de planta d'alfals i sembra. (Font foto: adventuresinthegoodland.blogspot.com)

Des del punt de vista de desenvolupament i aprofitament, l'alfals es conrea durant 4-5 anys. Durant aquest període de temps es poden arribar a fer entre 5 i 7 talls (sega), buscant el moment en què un 10% de les plantes es troben en floració, ja que és quan s'aconsegueix el major equilibri entre la quantitat i la qualitat. Després de cada tall l'alfals torna a créixer, fins al proper moment de floració en que es torna a tallar. A la primavera i estiu és cada 28-32 dies i a la tardor és cada 35-45 dies.

Després de la sega se sol fer un assecat al camp, que és variable en quan a temps depenent de la destinació. En el cas d'anar a la deshidratació, aquest serà d'unes 48 hores i ha de tenir un 30% d'humitat. Si és per consumir-se en forma de fens, l'assecatge serà de cinc o sis dies a fi de disminuir el percentatge d'humitat fins un 16-18%. A continuació s'esmenten les diferents formes d'aprofitament de l'alfals (Figura 6):

- a) **Consum en verd.** Segada i aprofitada en la menjadora o pasturatge directe en la pròpia parcel·la.
- b) **Ensitjat.** L'ensitjat consisteix en la conservació d'alfals amb elevat contingut d'humitat en sitges protegits de l'ingrés d'aire, llum i humitat. Amb la manca d'oxigen es produeix una fermentació per microorganismes que transformen els sucres solubles presents a la planta a un àcid orgànic d'alt poder d'acidificació, àcid làctic, que augmenta l'acidesa del medi (baixa el pH). L'alta acidesa i absència d'oxigen permeten conservar l'alfals durant molt temps.
- c) **Fenificat.** És la forma tradicional d'aprofitament a causa de les condicions climàtiques específiques que es donen en moltes zones productores d'Espanya. L'objectiu és reduir la humitat de l'alfals fins al voltant del 15%, per a que no actuïn microorganismes que facin malbé la planta i es pugui conservar.
- d) **Deshidratat.** És un procés industrial en el qual l'alfals passa d'un percentatge d'humitat del 45% (pre-assecat al camp), fins a arribar a nivells òptims de humitat

del 12%. L'alfals tallat i pre-assecat es fa passar per un cilindre o tambor horitzontal (*tromel*) pel qual s'injecta aire calent. La deshidratació, com a mètode de conservació del farratge, no altera pràcticament en res el seu valor nutritiu.

- e) **Adob verd.** Com altres lleguminoses, pot aportar tots o part dels requeriments de nitrogen del cultiu següent. Se sol fer l'últim any del cultiu.

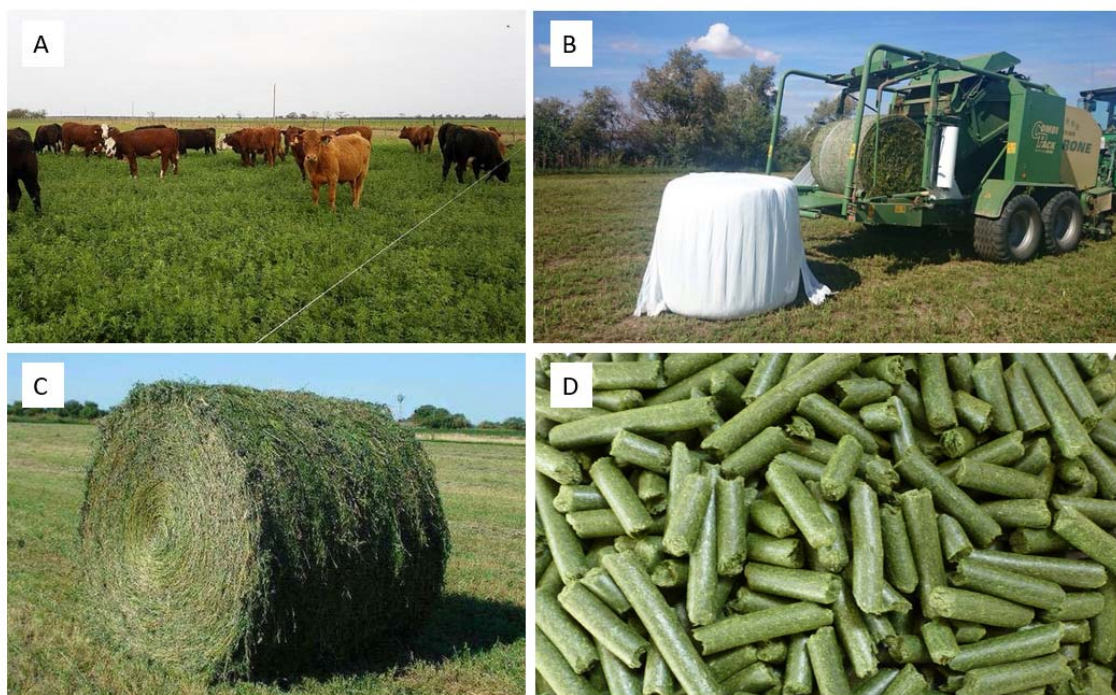


Figura 6. A) Alfals per a consum en verd. B) Alfals ensitjat. C) Alfals fenificat. D) Alfals deshidratat en forma de pellet. (Fonts fotos: A) [pregonagropecuario.com](http://pregonagropecuario.com) B) [agritoal.com](http://agritoal.com) C) [pregonagropecuario.com](http://pregonagropecuario.com) D) [cealpa.es](http://cealpa.es))

### 1.3. Principals plagues de l'alfals

#### 1.3.1. Plagues i danys que produeixen

Les plagues i malalties limiten la qualitat del farratge a causa d'una reducció de la relació fulla/tija, ocasionant un augment de la concentració de fibra i una reducció de la proteïna (Delgado et al., 2005).

A la Taula 1 es relacionen els organismes que constitueixen les plagues més comunes de l'alfals amb el seu nom comú i també la denominació en anglès (Almacellas i Perdiguier, 2007; Martín et al., 2019).

**Taula 1. Plagues més comunes de l'alfals.** (Font: Almacellas i Perdiguier, 2007, Martín et al. 2019).

Nom científic	Nom comú	Denominació en anglès
<i>Therioaphis trifolii</i> Monell	Pugó tacat	Spotted alfalfa aphid
<i>Sminthurus viridis</i> L.	Pulguilla	Lucerne flea
<i>Aphis craccivora</i> Koch	Pugó negre	Cowpea aphid
<i>Acrythosiphum pisum</i> Harris	Pugó verd	Pea aphid
<i>Helicoverpa armigera</i> Hübner	Oruga defoliadora	Cotton bollworm
<i>S. littoralis</i> Boisduval		African cotton leafworm
<i>Autographa gamma</i> Linnaeus		Silver Y
<i>Hypera postica</i> Gyllenhal	Cuca verda	Lucerne leaf weevil
		Alfafa weevil
<i>Apion pisi</i> F., <i>Apion</i> spp.	Apion	Pear-shaped pea weevil
<i>Sitona</i> spp.	Sitona	Pea weevil
		Pea and bean weevil
<i>Agrotis</i> spp., <i>Euxoa</i> spp., <i>Peridroma</i> spp., <i>Noctua</i> spp.	Cuc gris	Cutworms
<i>Colaspidema atrum</i> Olivier	Cuca	Lucerne beetle

D'aquestes plagues, a més de *l'H. postica* (apartats 1.3.2 i 1.3.3), a continuació es detallen les més significatives a la zona de la Vall de l'Ebre, com són els pugons, l'apion, la sitona i l'eruga defoliadora. Aquesta informació està extreta, principalment, de Martín et al., (2019).

#### 1.3.1.1. Pugons (Hemíptera)

Hi ha diferents espècies de pugó que són plaga a l'alfals: *Therioaphis trifolii* Monell (pugó tacat), *Aphis craccivora* Koch (pugó negre) i *Acrythosiphum pisum* Harris (pugó verd). D'aquestes espècies, les més vistes a camp durant els mostrejos realitzats a la part pràctica han estat el pugó negre i el pugó verd.

Els pugons són hemípters de la família Aphididae. Els adults poden variar de 2 a 5 mm segons l'espècie. *A. pisum* té un color verd clar característic (Figura 7), encara que és freqüent la presència d'exemplars de color rosat. En canvi, *A. craccivora* és de color negre, fàcilment distingible (Figura 7). Com altres tipus de pugons, tenen diverses generacions a l'any. Les nimfes de la primera generació apareixen a la primavera i donen lloc a femelles vivíparas àpteres que es reproduïxen asexualment per partenogènesi (generació d'un nou individu a partir d'un òvul sense fecundar). Quan la densitat de població és molt alta o s'esgota l'aliment apareixen exemplars alats per facilitar la colonització de noves plantes.





Figura 7. Pugó negre (*Aphis craccivora* Koch) i pugó verd (*Acyrthosiphum pisum* Harris). (Font fotos: infocampo.com.ar, pulgones.net).

Quan s'alimenten de la planta injecten toxines que poden provocar alteracions en el creixement, deformacions i clorosi. També produeixen melassa, que pot donar lloc a que apareguin fongs. Aquests fongs poden alterar el gust del farratge. El període més delicat és el rebrot després dels talls o bé abans que la planta tingui suficient estabilitat per tolerar i compensar millor els danys.

El llindar d'actuació varia en funció de l'altura de l'alfals, ja que les plantes són més tolerants quan van creixent. Depredadors, parasitoides i fongs tenen un paper molt important en el control natural de pugons en l'alfals. Així, a més de comptar pugons cal valorar la presència d'enemics naturals. Una proporció suficient entre enemics naturals i pugons pot fer innecessària l'actuació contra la plaga. Per tant, no seria necessari intervenir si hi ha un insecte auxiliar (coccinèl·lids adults i larves, larves de sírfids, larves de crisopa) per cada 10 pugons.

#### 1.3.1.2. *Apion pisi* F (Coleoptera)

És un coleòpter curculiònid que s'alimenta de diverses lleguminoses, encara que les larves es desenvolupen preferentment en l'alfals. Els adults tenen el cos en forma de pera, amb el rostre allargat en forma de bec cilíndric i arquejat i mesuren entre 2,5 i 3,5 mm. Són de color negre (Figura 8). Després d'un període de repòs (diapausa) a l'estiu, reprenen la seva activitat al setembre, quan s'aparellen. Fan la posta a l'interior dels brots i tiges. El període de reproducció és molt escalonat, des de setembre al juny de l'any següent. Les larves són groguenques.



Figura 8. *Apion pisi*: Larva, pupa i adult. (Font fotos: www.mindenpictures.com, terraevita.edagricole.it, www.biolib.cz)

Els danys més importants els realitzen les larves en devorar l'interior dels brots, la qual cosa pot retardar el creixement de la planta. En cas de grans infestacions a la tardor-hivern, els camps d'alfals mostren un aspecte marcit després del repòs hivernal. Els adults s'alimenten de les fulles i brots, però normalment no causen danys que afectin el rendiment del cultiu.

El període crític per al cultiu és a la tardor, abans i després del últim tall de l'alfals. És quan cal actuar per eliminar larves i postes. El que es pot fer és retardar l'últim tall per eliminar les postes d'ous i larves a l'interior dels brots.

#### 1.3.1.3. *Sitona* spp. (Coleòptera)

A la Vall de l'Ebre, les espècies més freqüents són *Sitona lineatus* Linnaeus i *S. discoideus* Gyllenhal. Són coleòpters curculiònids d'uns 4-6 mm, de color gris-marró. Les larves són blanques, àpodes (sense potes) i viuen sota terra. Els adults entren en activitat a la primavera i s'alimenten de les fulles de l'alfals i d'altres lleguminoses (Figura 9). Són d'hàbits nocturns o crepusculars i durant el dia solen romandre inactius. Les larves s'enterren i mengen les arrels i dels nòduls. De vegades, els adults arriben a consumir totalment la superfície foliar deixant únicament el nervi central. Malgrat això, és molt poc freqüent que arribin a ocasionar danys de consideració. Les larves tampoc solen causar danys importants. Com a mesures de control es recomana avançar el tall sempre que sigui possible.



Figura 9. Larva i adult de *Sitona* sp. (Font fotos: [www.agric.wa.gov.au](http://www.agric.wa.gov.au), [commons.wikimedia.org](https://commons.wikimedia.org))

#### 1.3.1.4. *Helicoverpa armigera* (Lepidòptera)

Aquesta espècie pertany al grup que s'anomena erugues defoliadores de l'alfals, que són lepidòpters que, majoritàriament, pertanyen a la família Noctuidae (Figura 10).

Els adults solen aparèixer a finals de primavera i les generacions es van succeint entre juny i octubre. La majoria de les espècies crisaliden a terra, a poca profunditat. Les

erugues d'*H. armigera*, tenen una gran variabilitat en el seu patró de coloració. Els adults tenen la capacitat per volar a grans distàncies, això fa que puguin ocasionar infestacions sobtades en alguns camps.



**Figura 10. *Helicoverpa armigera*: Larva, pupa i adult.** (Font fotos: [en.mercopress.com](http://en.mercopress.com), [extension.msstate.edu](http://extension.msstate.edu), [www.lepinet.fr](http://www.lepinet.fr)).

Les larves poden alimentar-se de totes les parts verdes de les plantes, encara que consumeixen principalment les fulles. Els danys més importants s'observen a l'estiu i principis de tardor. Encara que la seva presència al cultiu és habitual, rarament ocasionen danys importants. Avançar el tall és una mesura molt eficaç per controlar aquesta plaga.

### **1.3.2. *Hypera postica* (Coleòptera): Descripció biològica de l'insecte**

*H. postica* és un coleòpter curculiònid. Els adults mesuren 4-5 mm i són de color marró amb una banda ampla més fosca a la zona mitjana dorsal. Tenen el rostre allargat, característic dels curculiònids, i no es veuen amb facilitat al camp per la seva tendència a amagar-se i deixar-se caure a terra quan els molesten.

Les larves són àpodes i arriben a mesurar un màxim d'1 cm. En néixer tenen un color groguenc que, a mesura que van creixent, va canviant a color verd amb una línia blanca que recorre longitudinalment la zona mitjana dorsal. El cap és petit i de color marró.

Durant l'estiu, els adults passen un període de repòs i tornen a l'activitat a principis de la tardor. En aquest moment s'aparellen i fan la posta d'ous, que depositen a l'interior de les tiges a través d'un petit orifici fet per la femella. Aquests són ovalats i de color groc. Els adults romanen en l'alfals durant tot l'hivern i poden seguir realitzant postes sempre que les condicions siguin favorables.

Just abans de la primavera neixen les larves i es desplacen a la zona apical (puntes) de les tiges per alimentar-se. L'eclosió dels ous però, és esglaonada i per això, durant la primavera, es troben larves de diferents edats i mides en una mateixa parcel·la. Durant

aquest període, a la primavera també, i a mesura que pugen les temperatures, els adults tornen a fer una segona posta d'ous.

Les larves passen per quatre fases i quan acaben el seu desenvolupament, pupen a l'interior d'uns capolls de seda blanquinosos i poc espessos que queden adherits a les fulles o a terra. Els adults de la nova generació romanen durant un temps en els camps d'alfals, alimentant-se sense causar danys importants, fins que fan el repòs estival en llocs protegits.

A Espanya, es creu que *H. postica* fa una única posta a l'any, a la tardor/hivern. Per això és als primers talls de la primavera quan els ous eclosionen i les larves causen danys importants.

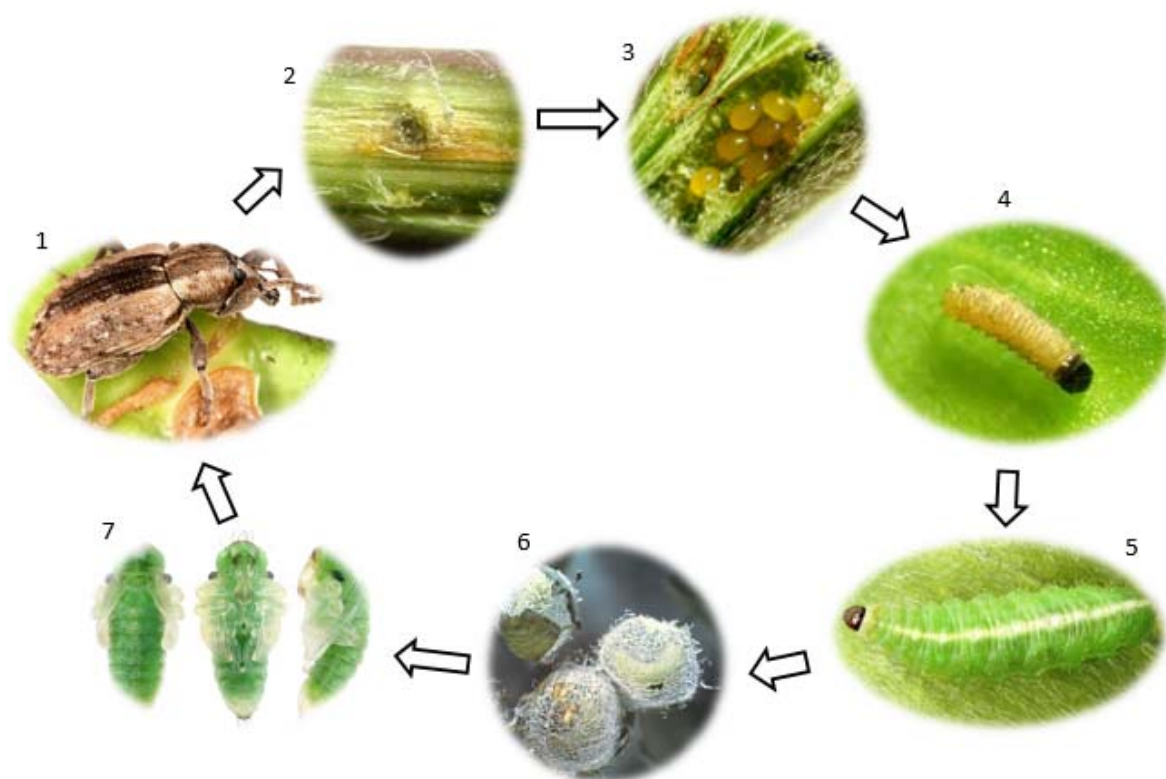


Figura 11. 1) Adult 2) lloc de posta 3) posta (ous) 4) larva L1 (primera fase) 5) larva L4 (última fase) 6) prepupa 7) pupa. (Font: elaboració pròpia a partir d'imatges extretes de [www.biolib.cz](http://www.biolib.cz), [ruralcat.gencat.cat](http://ruralcat.gencat.cat), [bugguide.net](http://bugguide.net), [extension.entm.purdue.edu](http://extension.entm.purdue.edu), [hiveminer.com](http://hiveminer.com)).

**Síntomes i danys:** Les larves acabades de sortir dels ous es protegeixen i s'alimenten dels brots tendres, perforant petits orificis (són difícils d'apreciar). Les més grans són les que causen els danys més importants. Es mengen les fulles deixant únicament els nervis (Figura 12). Pot arribar a provocar importants defoliacions que provoquen un color blanquinós a les zones afectades. Això pot afectar al creixement de les plantes, encara que si l'alfals ha assolit un cert nivell de desenvolupament, pot tolerar l'*H. postica* sense experimentar danys de consideració.





Figura 12. Planta d'alfals menjada per larves d'*Hypera postica*. (Font: [invasive.org](http://invasive.org), [forages.osu.edu](http://forages.osu.edu)).

**Període crític per al cultiu:** La temperatura té un efecte molt important en el desenvolupament de totes les fases de l'*H. postica* i, per tant, els períodes d'activitat poden canviar d'un any a l'altre. El dany més important és en el primer tall, encara que hi ha zones que pot ser en el segon tall. Els majors nivells de població solen donar-se en els mesos d'abril o maig.

**Mesures de prevenció:** Avançar el tall és una mesura eficaç per controlar aquesta plaga i sempre preferible a la intervenció química. Una altra mesura preventiva és el tall de l'alfals en parada hivernal (desembre, gener). Aquest elimina un gran nombre de les posades realitzades a la tardor-hivern i redueix de forma molt important les poblacions de larves, i per tant els danys a la primavera. L'alçada d'aquest tall ha de ser propera a terra, però tenint cura de no fer malbé les corones. L'entrada dels ramats a l'hivern pot aconseguir un efecte similar al del tall hivernal. Malgrat això, a la Vall de l'Ebre a les últimes dècades s'han anat reduint els ramats, també per la manca de pastors, el que ha fet que aquesta mesura de control hagi anant desapareixent, i d'aquí també un creixement de la plaga (Sopena, 2019).

**Llindar i moment d'intervenció:** El llindar d'actuació sols variar segons l'alçada de la planta:

- Alçada inferior a 15 cm: 25% de plantes amb danys evidents en el terç apical.
- De 15 a 60 cm: 20 larves / passi de màniga.
- Superior a 60 cm: no intervenir o avançar el tall.

**Control biològic:** Encara no hi ha cap mètode de control biològic disponible per al control d'*H. postica* (Martín et al., 2019). Malgrat això, hi ha diversos organismes que exerceixen un control biològic natural d'aquesta plaga. Entre d'altres, s'ha confirmat la presència en diverses zones de la Vall de l'Ebre dels himenòpters ichneumònids *Bathyplectes anurus* i *B. curculionis*, tots dos parasitoides de larves d'*H. postica*. En tots els estudis duts a terme en aquesta zona productora, *B. anurus* ha resultat ser l'espècie clarament dominant. La seva incidència pot variar molt d'uns anys a altres però la seva



presència al cultiu hauria de ser tinguda en compte en els programes de gestió integrada (Martín et al., 2019).

### 1.3.3. *Hypera postica*: Parasitoidisme

*Bathyplectes* spp. són com a vespes petites i no punxegudes. El Departament d'Agricultura dels Estats Units els va introduir el 1911 des d'Itàlia (espècie autòctona) com a part d'un esforç de control biològic contra l'*H. postica* de l'alfals (Hogg, 1994).

Les dues espècies de *Bathyplectes* són similars en els hàbits. Ambdós posen els ous en larves d'*H. postica*, preferint posar-los en els primers estadis de les larves. La larva de vespa s'alimenta internament i devora lentament la larva d'*H. postica*, matant el seu hoste (Figura 13).

El cicle biològic de *Bathyplectes* sp. va lligat al de l'*H. postica*. L'activitat de vol d'adults de *Bathyplectes* sp. se sincronitza amb el període d'activitat primaveral de les larves d'*H. postica*. El vol dels adults pot durar diverses setmanes i els nivells màxims de parasitoidisme es produeixen entre 1 i 2 setmanes abans del pic de la població de larves d'*H. postica*.

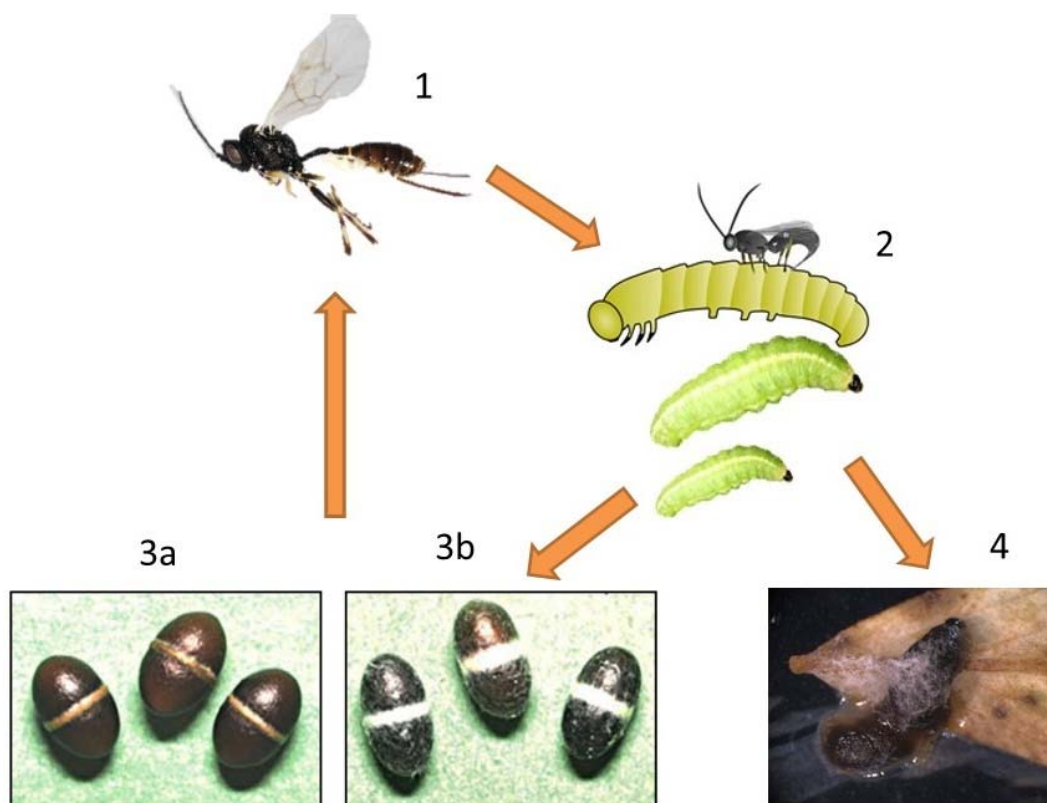


Figura 13. Cicle de *Bathyplectes* sp. i parasitoidisme de les larves d'*Hypera postica*. 1) Adult de *Bathyplectes* sp. 2) Posta d'ous de *Bathyplectes* sp. en larves d'*H. postica*. 3a) Pupes de *Bathyplectes anurus*. 3b) Pupes de *Bathyplectes curculionis*. 4) Larva d'*H. postica* menjada per *Bathyplectes* sp. (Composició elaboració pròpia a partir d'imatges extretes de Hogg (1994) i Levi (2018)).

El *B. anurus*, que pon aproximadament 300 ous, té una sola generació a l'any, amb totes les pupes parasitoides produïdes per parasitoidisme primaveral roman en diàpauza fins a la primavera següent, quan les larves d'*H. postica* són de nou abundants. El *B. curculionis*, en canvi, té una segona generació parcial que parasita les larves d'*H. postica* que es poden desenvolupar durant l'estiu. Les femelles de *B. curculionis* posen aproximadament 200 ous a l'any.

El *B. anurus* es considera l'agent de control biològic superior, especialment en climes calorosos. Això es deu en part a que el *B. anurus* té un potencial de reproducció del 50% més gran que *B. curculionis* (Hogg, 1994). També les larves d'*H. postica* són capaces, en molts casos, de matar els ous de *B. curculionis* mitjançant un procés conegut com a encapsulació.

## 2. IDENTIFICACIÓ MOLECULAR D'INSECTES

### 2.1. Introducció

Un bon sistema de control de plagues comença amb la identificació precisa de l'organisme causant del dany. Només així es pot dissenyar un tractament adequat (Dawei et al., 2019). La Zoologia, i en concret la seva branca d'**Entomologia** és la part de la ciència biològica que s'encarrega de l'estudi dels insectes: la seva morfologia, biologia, fisiologia i bioquímica. També s'ocupa de la seva classificació i dels factors que fan canviar les seves poblacions.

Una branca de l'entomologia és l'**Entomologia Agrícola**, que estudia els insectes que ataquen les plantes cultivades o silvestres de les quals es pugui obtenir beneficis econòmics o mediambientals. A més, ajuda a determinar mesures racionals de control i estudia altres insectes beneficiosos que poden ajudar en el control de les plagues (paràsits i depredador).

Tradicionalment, els insectes s'han identificat i classificat mitjançant l'estudi de la seva morfologia, però actualment, per casos més concrets o externament difícils d'identificar (com és el cas d'alguns parasitoidismes), les **tècniques moleculars** són una alternativa acurada respecte a les tècniques clàssiques d'identificació.

Les tècniques moleculars són un terme general que engloba un conjunt de tècniques de biologia molecular utilitzades per a la identificació i anàlisi de marcadors biològics en el genoma i proteoma (el codi genètic i com s'expressen aquests gens com proteïnes). Hi ha molta varietat de tècniques moleculars. Algunes, com les **tècniques immunològiques**, se centren en analitzar proteïnes; altres en **detecció microscòpica**, utilitzant tincions i, també, moltes altres en **l'anàlisi de l'ARN o l'ADN**. Aquesta última

metodologia té molts avantatges, ja que és una tècnica ràpida, molt sensible i amb molta exactitud. Requereix l'ús de molt poca quantitat de mostra i, a més a més, cada vegada és més barata.

En concret, en aquest treball la identificació de seqüències genètiques exclusives d'*H. postica* pot permetre, posteriorment, diferenciar de forma ràpida les larves parasitades de les que no ho estan. Hi ha estudis que confirmen la utilitat d'aquest mètode per identificar parasitoides en plagues, com per exemple en alguns lepidòpters (Frank et al., 2017).

Seguidament es presenten els fonaments de les tècniques d'identificació molecular d'insectes, com a antecedents de les tècniques utilitzades en la part experimental del present treball de recerca.

## **2.2. Tècniques d'identificació molecular d'organismes**

### **2.2.1. Extracció d'ADN**

Tal com s'ha esmentat anteriorment, l'extracció de l'ADN és una tècnica ràpida, molt sensible i amb molta exactitud en la identificació d'organismes. Consta de diverses etapes bàsiques (Velázquez et al., 2012).

#### **a) Trencament de les cèl·lules i homogeneïtzació dels teixits**

L'homogeneïtzació, mecànica o química, consisteix a trencar les unions entre les cèl·lules per facilitar la interacció amb les solucions de lisi que ajuden a alliberar el material genètic. La forma d'homogeneïtzació depèn de les característiques de la mostra. En general, s'aplica una combinació d'agents físics i químics que trenquen teixits.

- **Mecànica**: És recomanable en els casos de teixits tous. Es poden incloure polsos d'agitació utilitzant vòrtex. Quan es tracta de cèl·lules vegetals, fongs, bacteris, o càpsides virals, se sol congelar la mostra en nitrogen líquid i es polvoritza mentre es manté congelada amb un morter, evitant així la degradació dels àcids nucleics. Una altra manera és amb bastonets de plàstic (tips), aquests disgreguen la mostra mitjançant fricció amb la paret del tub que conté la mostra. És recomanable afegir una mica del buffer de lisi abans d'iniciar el procés. Aquestes solucions desnaturalitzen a les proteïnes i mantenen estable l'ADN.
- **Química**: És recomanable per a bacteris, mostres petites de teixits frescos, animals o sang. La mostra es manté en solució a altes temperatures en presència de

detergents i proteases. Aquestes substàncies trenquen les unions entre les cèl·lules o, fins i tot, poden perforar la membrana cel·lular. Durant el procés de lisi, les interaccions entre les molècules que componen la paret cel·lular, la membrana cel·lular i nuclear es modifiquen o destrueixen permetent que els àcids nucleics s'alliberin al medi.

#### b) Extracció de proteïnes i lípids

L'extracció de les proteïnes és molt important. Els enzims poden degradar els àcids nucleics. També, altres proteïnes poden interferir en l'extracció d'àcids nucleics al·ligar-se a l'ADN. Els lípids poden contaminar l'ADN extret interferint negativament en processos posteriors d'anàlisi d'aquest ADN. En aquesta etapa se separa l'ADN de les proteïnes i lípids mitjançant solvents orgànics i cicles de centrifugació. S'utilitza la forta tendència hidrofílica dels grups fosfat per separar-los en medis aquosos, mentre que les proteïnes i els lípids se separen en solvents orgànics. Les proteïnes es desnaturalitzaran i precipitaran a la interfase després de la centrifugació, la fase líquida conté els àcids nucleics (ADN i ARN), mentre que la fase sòlida conté les proteïnes i els lípids. La fase líquida i la sòlida se separen per centrifugació, i això permet aïllar l'ADN. Els solvents que s'utilitzen freqüentment són el fenol, el cloroform i l'alcohol isoamílic.

#### c) Precipitació de l'ADN

Després d'eliminar els lípids i les proteïnes, es recupera l'ADN fent-lo precipitar. Per a això, s'addiciona etanol i solucions amb altes concentracions de ions de sodi o amoni que s'uneixen als grups fosfat, aquesta barreja redueix les forces repulsives entre les cadenes i permet que l'ADN es plegui sobre si mateix fent-lo insoluble. La centrifugació d'aquesta solució permet que l'ADN precipiti al fons en forma de pellet i es separi de l'etanol. Les restes d'etanol s'eliminen.

Actualment, per a l'extracció de l'ADN hi ha processadors de mostres que apliquen totes aquestes fases de forma automàtica. Un exemple és el **QIAcube** (Figura 14). Aquest processador permet l'extracció simultània d'àcids nucleics en varies mostres, mitjançant un processament totalment automatitzat de fins a 12 mostres. L'instrument consta d'una centrífuga, un agitador escalfador, sistema de pipetatge i una pinça robòtica. El QIAcube té preinstal·lat diversos protocols per la purificació d'ARN, ADN genòmic, ADN plasmídic, àcids nucleics virals o proteïnes, també per la neteja d'ADN i ARN. L'usuari selecciona un protocol utilitzant la pantalla tàctil i carrega plàstics, mostres i reactius a la taula de treball QIAcube.



Figura 14. Màquina QIAcube de QIAGEN. (Font: Elaboració pròpia)

### 2.2.2. Quantificació de l'ADN extret

Una vegada extret l'ADN és necessari conèixer la seva concentració i la seva puresa per poder utilitzar-lo posteriorment per altres aplicacions, com per exemple, per procedir amb la tècnica de PCR (Reacció en cadena de la polimerasa). El mètode més utilitzat per quantificar l'ADN és l'espectrofotometria, que és el que es va dur a terme en el present treball de recerca. Aquest mètode consisteix en detectar l'absorció de rajos UV per l'ADN, ja que els àcids nucleics absorbeixen llum d'una longitud d'ona de 260nm. La quantitat de llum absorbida és proporcional a la concentració d'ADN en la mostra: 1 unitat d'absorbància a 260nm equival a 50 µg d'ADN de doble cadena per ml. És convenient llegir en un espectre de longituds d'ona, per comprovar que el màxim d'absorció s'obté a 260nm. A 230nm absorbeixen els polisacàrids i a 280nm les proteïnes. La relació d'absorbàncies 260nm/280nm és l'indicador de la puresa d'aquest ADN, i el resultat òptim és al voltant d'1,8.

L'aparell utilitzat per fer aquest tipus de quantificacions és un espectrofotòmetre UV/VIS, com per exemple el **NanoDrop** (Figura 15). Aquest és un espectrofotòmetre UV/VIS d'última generació que permet la quantificació de microvolums (0,5-2 µl de mostra) d'ADN en un espectre des 220nm a 750nm.

Segons el manual de l'aparell, aquest funciona de manera que la solució d'ADN interconnecta dos extrems de cable de fibra òptica. Una



Figura 15. Aparell NanoDrop. (Font: bionordika.no)

bombeta de xenó emet llum, travessa la mostra i passa a l'espectrofotòmetre. L'instrument està connectat a un ordinador amb un programa que analitza i processa les dades.

- **Determinació de la puresa:**

**Rati 260/280** → A260/A280 Entre 1,8 i 2,2

Els aminoàcids aromàtics absorbeixen a 280nm, per tant, aquest valor ens indica la presència de contaminació proteica.

**Rati 260/230** → A260/A230 entre 2,0 i 2,2

L'absorció a 230nm indica contaminació de fenol o altres compostos.

### 2.2.3. Amplificació per PCR d'un gen

Per identificar i amplificar un fragment genètic concret dins d'un genoma és necessari conèixer primer la seqüència completa del gen. Molts investigadors s'han dedicat a seqüenciar parts de l'ADN de diferents espècies, les quals queden registrades en bases de dades científiques. En el cas d'estudis d'identificació d'espècies, aquesta font d'informació és imprescindible per poder escollir el fragment de gen que es farà servir per diferenciar-les. Un cop seleccionat aquest fragment, és necessari el disseny dels encebadors que es faran servir per amplificar-lo. Els encebadors són fragments curts d'ADN de seqüència complementaria a les dels extrems del fragment del gen que es vol amplificar. A l'hora de dissenyar-los s'ha de tenir en compte la quantitat de nucleòtids que han de tenir; l'òptim és entre 20 i 25 nucleòtids, ja que si són massa curts, els fragments són inespecífics i es poden hibridar a altres parts del gen que no interessa amplificar i en el cas de que siguin massa llargs hi pot haver pèrdua de rendiment en la reacció. A més, s'ha d'evitar que tinguin seqüències complementàries ja que es podrien formar bucles interns.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 16) és una reacció enzimàtica in vitro que amplifica milions de vegades una seqüència específica d'ADN durant variis cicles repetits en els que la seqüència d'interès es copiada. Per dur a terme aquest procés, la reacció aprofita l'activitat de l'enzim ADN polimerasa, que té la capacitat de sintetitzar naturalment l'ADN a les cèl·lules. L'ADN polimerasa utilitzada és



Figura 16. Aparell PCR. (Font: elaboració pròpia)

la Taq polimerasa, que prové d'un bacteri anomenat *Thermus aquaticus*, descobert en aigües termals, i que pot catalitzar la reacció de polimerització de l'ADN a altes temperatures.

Partint d'aquest principi, la PCR es basa en la repetició d'un cicle format per tres etapes (Figura 17):

- a) **Desnaturalització** de l'ADN de doble cadena: la doble hèlix d'ADN se separa en dos cadenes. Per a això es realitza una incubació de la mostra a altes temperatures (93-97°C). La renaturalització es produirà quan la temperatura disminueixi.
- b) **Hibridació** dels encebadors a la zona 3' específica de cadascuna de les cadenes: els encebadors s'uneixen a les zones 3' complementàries dels extrems del fragment que volem amplificar. Es realitza gràcies a la baixada de la temperatura (50-65°C).
- c) **Extensió de l'encebador** per actuació de l'ADN polimerasa: es produeix la síntesi d'una cadena senzilla d'ADN (produint-se un fragment de doble cadena per la complementarietat) en la direcció 5'-3' mitjançant l'enzim ADN polimerasa, el qual incorpora les bases complementàries presents en el medi seguint la cadena motlle.

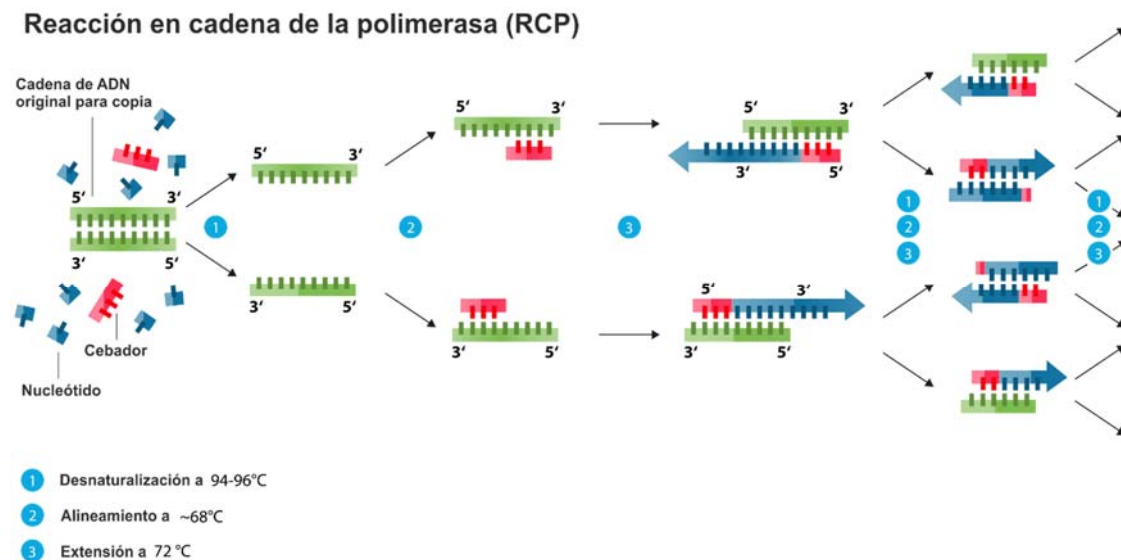
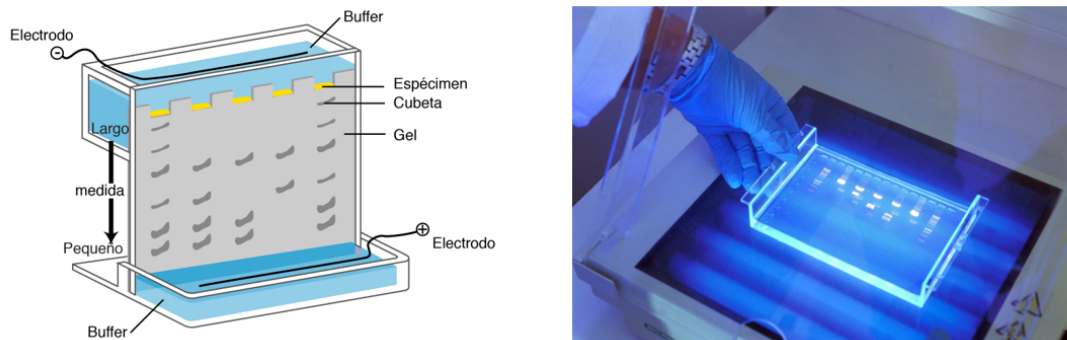


Figura 17. Esquema etapes PCR. (Font: [www.jotdown.es](http://www.jotdown.es))



#### 2.2.4. Electroforesi

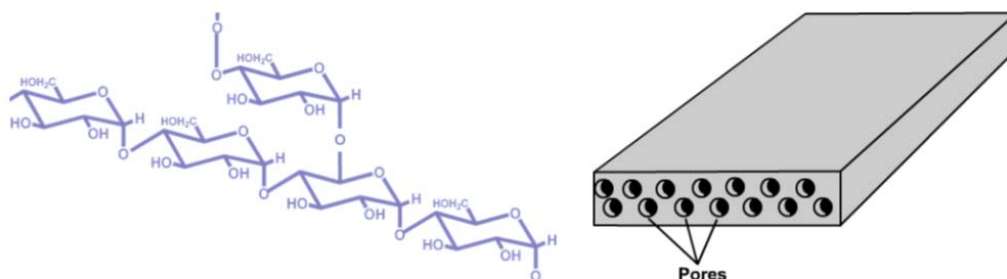
Es tracta d'una tècnica bàsica, tant per a l'anàlisi com per la purificació dels àcids nucleics i proteïnes. S'utilitza per separar mescles d'aminoàcids, de proteïnes i també de fragments d'àcids nucleics segons la seva càrrega elèctrica i el seu pes molecular. El seu funcionament es basa en separar les macromolècules en funció de la seva velocitat de moviment a través d'un gel sotmès a un camp elèctric (Figura 18). El fonament de la tècnica es basa en que quan una molècula amb càrrega se sotmet a un camp elèctric, es desplaça cap a l'elèctrode amb càrrega oposada.



**Figura 18.** Cubeta d'Electroforesi i detecció dels gens en gel d'agarosa. (Font: genome.gov, vitagenes.com)

El suport en que es du a terme aquest procés és diferent en funció del tipus i de la mida de les molècules que es volen separar. En el cas de mescles de proteïnes, generalment es fan servir gels d'acrilamida-bisacrilamida. En el cas de voler separar fragments d'àcids nucleics es fan servir usualment gels d'agarosa. L'agarosa es tracta d'un polisacàrid lineal que s'extreu de les algues i que té la propietat de dissoldre's en escalfar-se a 65 °C i al refredar-se se solidifica en forma de gel d'elevada porositat. Segons la concentració d'agarosa es genera una matriu de diverses densitats formada per una complexa xarxa de porus per on es poden desplaçar els fragments d'àcids nucleics a diferents velocitats, en funció de la seva mida (Figura 19). La velocitat a la qual les molècules de l'àcid nucleic es mouen està determinada per la seva habilitat de penetrar a través dels porus. Per als fragments lineals de doble cadena d'ADN, reflecteix la mesura de la molècula (la longitud del fragment d'ADN).



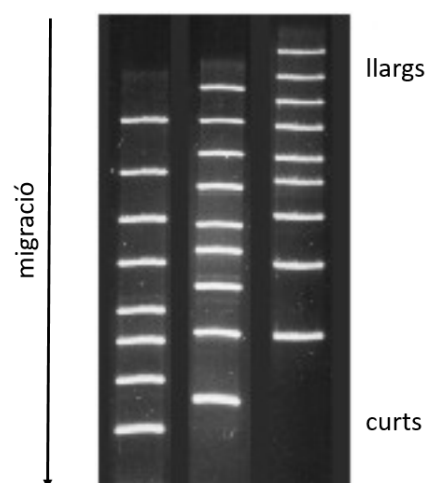


**Figura 19.** Molècula d'agarosa i xarxa de porus de l'agarosa. (Font: Docent UDL).

Les molècules dels àcids nucleics tenen càrrega negativa en els seus grups fosfat i per tant es desplacen cap al pol positiu (ànode). A mesura que es mouen a través del gel, aquest ofereix més resistència al pas dels fragments més llargs que dels curts. Això provoca que els fragments d'ADN quedin separats d'acord amb la seva longitud formant el que s'anomenen bandes d'ADN.

La mobilitat de l'ADN depèn de la composició i de la força iònica del buffer d'electroforesi:

- En absència d'ions, la conductivitat elèctrica és mínima i l'ADN es mou lentament.
- En un medi amb una concentració iònica alta, com és el tampó que es fa servir a l'electroforesi, la conductància elèctrica és molt eficient i es genera calor.



**Figura 20.** Fragments d'ADN lineals separats en gel d'agarosa. (Font: Docent UDL)

El desplaçament de les molècules d'ADN (o la migració) (Figura 20) està influenciada per:

- La composició de la força iònica del tampó d'electroforesi.
- El percentatge d'agarosa del gel: a major percentatge, la mida dels seus porus serà més petita i els fragments d'ADN es mouran més lentament.
- El temps de l'electroforesi.
- La longitud i complexitat de l'ADN

### 2.3. Aplicacions de la identificació molecular d'insectes en el control de plagues

L'èxit d'un programa de control de plagues basat en el control biològic està en la identificació correcta dels actors que intervenen, tant de les plagues com els seus enemics naturals (Agustí i Gabarra, 2013). Així, durant els darrers anys s'han desenvolupat tècniques i posat a punt diversos marcadors moleculars per a la correcta identificació d'enemics naturals. Algunes aportacions són les de Castañé et al. (2013), que van desenvolupar marcadors moleculars per a diferenciar dues espècies de depredadors molt abundants en cultius hortícoles, *Macrolophus melanotoma* y *M. pygmaeus*. La gran similitud morfològica d'aquestes espècies, al menys a l'etapa ninfal, va fer que es confonguessin durant anys, amb el consegüent risc a l'hora d'identificar les plantes hostes d'on provenien les seves poblacions naturals.

Un cas similar, que s'està estudiant actualment pel Grup de Recerca Control Integrat de Plagues Agrícoles i Forestals de la Universitat de Lleida, és la diferenciació d'espècies dins del mateix gènere *Bathyplectes* sp., *curculionis* i *anurus*. També, la diferenciació entre individus de generes diferents, com seria el cas de la relació entre *H. postica* i *Bathyplectes* sp., estudiat en aquest treball.

## PART EXPERIMENTAL

### Identificació d'*Hypera postica* Gyllenhal (Col. Curculionidae) (plaga de l'alfals), amb eines moleculars.

#### 1. Introducció del cas pràctic

El present cas pràctic està relacionat amb un projecte portat a terme per un grup de recerca de la Universitat de Lleida.

Dintre dels objectius d'aquest projecte es desenvolupen diferents tasques encaminades a millorar el coneixement de la biologia de les plagues, dels seus enemics naturals i de les interaccions amb l'entorn, amb la finalitat de millorar el control integrat.

En concret, per al cultiu d'alfals, en aquest projecte de recerca es pretén:

- a) Conèixer millor el cicle de vida de la plaga *H. postica* i la seva relació amb la temperatura. Actualment, no es coneix amb seguretat si a la Vall de l'Ebre *H. postica* té un únic cicle de vida per any o, segons la temperatura, es pot donar més d'un cicle, amb la qual cosa la plaga pot causar més danys. La metodologia d'aquest objectiu es basa en la cria controlada de larves a diferents temperatures per veure la seva taxa de creixement de la població.
- b) Investigar sobre la diferenciació dels parasitoides d'*H. postica*: *Bathyplectes* sp., mitjançant tècniques moleculars. Donat que els adults de *B. anurus* i *B. curculionis* són molt difícils de distingir morfològicament, s'ha pensat que amb l'ús de tècniques moleculars es podrà arribar a distingir aquestes dues espècies mentre parasiten larves d'*H. postica*. Per això, un primer pas és la identificació inequívoca d'*H. postica* mitjançant l'amplificació d'una seqüència d'un gen d'interès que formi part del genoma d'*H. postica* però no de *Bathyplectes* sp. [Part d'aquest objectiu és el que s'ha realitzat en el present treball de recerca]. Després, s'haurà de fer el mateix amb *Bathyplectes* sp. Finalment, això permetrà poder conèixer quin nivell de parasitoidisme té *H. postica* en determinats camps que siguin analitzats amb aquestes tècniques.
- c) Identificar si hi ha una relació entre l'afectació d'*Hypera postica* en camps d'alfals i el seu entorn o condicions de paisatge, com poden ser la superfície d'alfals, d'altres cultius, vegetació natural i altres variables del territori al voltant a diferents zones d'estudi de la Vall de l'Ebre.

## 2. Hipòtesi

D'acord amb aquest marc general, l'objectiu de la part experimental del present treball de recerca ha estat l'aplicació d'una tècnica molecular per identificar la seqüència d'un gen que permeti diferenciar *H. postica* de dues espècies de *Bathyplectes*: *B. anurus* i *B. curculionis*. Aquest procés és un primer pas per, finalment, poder diferenciar individus d'*H. postica* parasitats per *Bathyplectes* sp. d'individus no parasitats. A més, s'ha fet una cria controlada d'*H. postica* per conèixer el seu cicle de vida més detalladament.

D'acord a aquests antecedents i els exposats a la Part Teòrica, i donat que encara no hi ha cap mètode de control biològic disponible per a *H. postica*; que l'èxit dels programes de control de plagues basat en el control biològic està en la identificació correcta tant de les plagues com els seus enemics naturals; i que *H. postica* causa danys importants a l'alfals, el present treball de recerca es planteja contestar les següents preguntes:

- a) És possible identificar algun gen d'interès que permeti diferenciar *H. postica* de *Bathyplectes* sp.?
- b) La regió escollida del gen d'interès, és útil per diferenciar aquestes espècies mitjançant l'aplicació de tècniques d'extracció i amplificació d'ADN?

## 3. Materials i mètodes

### 3.1. Materials

En aquest treball de recerca es va utilitzar material biològic i no biològic.

El **material biològic** va ser:

- Larves, prepupes, pupes i adults d'*H. postica*. Els adults d'*H.*, per posteriorment fer la cria controlada de larves on es va analitzar l'ADN, van ser capturats en camps d'alfals localitzats a Bellví i Bell-Lloc (Lleida), Esplús i Montsó (Osca) i Bujaraloz (Saragossa) a començaments de febrer i abril del 2019.
- Adults de *Bathyplectes* sp. nascuts de pupes resultants del parasitoidisme de larves d'*H. postica* capturades als camps de mostreig.
- Plantes d'alfals (cultivades en ambient "controlat").

El **material no biològic** va ser diferent tipus d'utilatge (Taula 2) i substàncies i reactius per a l'aplicació de les tècniques moleculars (Taula 3).

**Taula 2. Utilatge utilitzat pel desenvolupament del cas pràctic del present treball de recerca.**

<b>Mostrejos al camp</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mànegues,</li> <li>• Bosses de plàstic</li> <li>• Etiquetes</li> <li>• Nevera frigorífica</li> </ul>
<b>Cria <i>Hypera postica</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubs de vidre</li> <li>• Capses de plàstic amb la tapa foradada de 10x10x10</li> <li>• Aveuradors → cotò i bluetac</li> <li>• Pot de vidre</li> <li>• Gomes elàstiques</li> <li>• Tela microforadada per tapar les capsas</li> <li>• Cambra regulada a 20°C</li> </ul>
<b>Extracció ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubs Eppendorfs d'1,5 i 2 ml</li> <li>• Micropipeta de 0,5 a 10µl</li> <li>• Agitador Termomixer</li> <li>• Bastonets de plàstic (Tips)</li> <li>• Gel picat</li> <li>• Microcentrífuga, Termobloc</li> <li>• Processador automàtic de mostres QIAcube amb els seus accessoris</li> </ul>
<b>Quantificació ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espectrofotòmetre Nanodrop 1000</li> <li>• Software NanoDrop 1000 V3.8</li> <li>• Micropipeta de 0.5 µl</li> </ul>
<b>PCR ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipetes</li> <li>• Eppendorf PCR (0,2 ml)</li> <li>• Congelador -20</li> <li>• Termociclador</li> </ul>
<b>Electroforesis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matràs Erlenmeyer 100 ml, Proveta 100 ml</li> <li>• Bàscula</li> <li>• Paper d'alumini</li> <li>• Microones</li> <li>• Cubeta electroforesi, Font d'electroforesi</li> <li>• Transil·luminador Geldoc XR+ Biorad</li> <li>• Software anàlisi imatges Geldoc XR+ Biorad</li> </ul>

**Taula 3. Substàncies i reactius utilitzats en la part pràctica del present treball de recerca.**

<b>Cria <i>Hypera postica</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aigua amb sucre i mel (30%)</li> </ul>
<b>Extracció ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AP1 Lysing Buffer</li> <li>• Buffer P3</li> <li>• RNAsa</li> <li>• Buffer AN1</li> <li>• Buffer AN2</li> <li>• Buffer AE</li> </ul>
<b>Quantificació ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aigua</li> <li>• Mostra d'ADN</li> </ul>
<b>PCR ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aigua miliQ autoclavada: Aigua purificada mitjançant filtració per un procés d'osmosi inversa.</li> <li>• Taq polimerasa</li> <li>• Desoxinucleotids (dNTP's): A/T/G/C afegits en igual concentracions.</li> <li>• Encebadors</li> <li>• Tampó 10x: Manté el pH adequat pel funcionament de la DNA polimerasa (tampó que et dona la casa comercial conjuntament amb la Taq polimerasa)</li> <li>• ADN motlle</li> </ul>
<b>Electroforesis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarosa</li> <li>• TAE1X</li> <li>• TRIS</li> <li>• àcid bòric</li> <li>• EDTA</li> <li>• aigua milliQ</li> <li>• glicerol</li> <li>• TEpH8</li> <li>• blau de bromofenol</li> <li>• marcador de pes molecular 1Kb</li> </ul>

### 3.2. Mètodes

El procés metodològic portat a terme en el present treball de recerca va començar pel mostreig i captura d'insectes a camps d'alfals. Aquestes mostres es van analitzar al laboratori, per fer recompte dels diferents insectes capturats. Amb individus adults d'*H. postica* es va fer una cria massiva controlada per dur a terme els diferents processos d'identificació molecular de l'espècie. Paral·lelament, es va fer una altra cria individualitzada controlada per tal de seguir el cicle d'*H. postica* detalladament. Seguidament es detalla la metodologia duta a terme en cada fase del treball.

### 3.2.1. Mostreig d'insectes al camp

El mètode més utilitzat per recollir mostres d'insectes a l'alfals és la mànega entomològica, que permet obtenir una estimació relativa de la densitat de població de la zona que s'està estudiant. Aquesta mànega està formada per una bossa de tela espessa en forma de con, ajustada a una cercle que va unit a un mànec. La tècnica consisteix en fer diverses passades amb la mànega per la parcel·la de manera ordenada, per tal d'abastir tota la parcel·la i agafar una mostra de la població real (Figura 21). Els insectes queden a la parta baixa de la mànega i posteriorment són dipositats en una bossa de plàstic numerada.



**Figura 21. Mònega entomològica i mostreig d'insectes a un camp d'alfals amb la mànega. (Font: Elaboració pròpia).**

Per fer el mostreig, els camps d'alfals es distribueixen en quatre parts. Per cada part es mostregen tres punts aleatòriament (s'hi passen cinc mànegues per punt), i un quart punt "in vivo" (Figura 22). Es diuen així perquè aquestes mostres s'analitzen al laboratori amb els insectes vius. Dins del projecte de recerca, aquestes mostres serveixen bàsicament per veure si: a) Les larves d'*H. postica* capturades estan parasitades o no al final del seu desenvolupament en condicions controlades, el qual és un mètode clàssic llarg a nivell temporal degut a que s'ha d'esperar a que la larva d'*H. postica* completi el seu cicle biològic; b) per portar un recompte del número de *Bathyplectes* sp. adults capturats al camp i per controlar els enemics naturals de l'*H. postica* presents en les diferents èpoques de mostreig.

Cada mostra està etiquetada amb el nom del camp, la zona del camp (1, 2, 3, 4) la data de mostreig i la part a la qual corresponen (segat o no segat).

Es creu que el cicle d' *H. postica* i la quantitat d'individus es poden veure afectats si la planta es talla i es treu del camp després del període de posta (finals d'hivern), ja que si es redueix el numero de postes, es redueix també el numero de larves futures.



**Figura 22. Divisió del camp per al mostreig d'insectes i localització dels punts aleatoris de mostreig.** (Font: Elaboració pròpia. Imatge Google Earth d'un camp d'alfals localitzat a Montsó, Osca)).

En aquest treball es van analitzar mostres recollides en camps d'alfals localitzats a Bellvís i Bell-Lloc (Lleida), Esplús i Montsó (Osca) i Bujaraloz (Saragossa). Les mostres es van recollir durant els mesos de febrer i abril de 2019.

Les mostres dels punts aleatoris s'utilitzaran en una altra part del projecte de recerca general per fer un estudi estadístic (no desenvolupat en el present treball de recerca), mentre que els insectes de les mostres "in vivo" es van utilitzar per fer les cries controlades. Els parasitoides es van ficar en tubs apart, per tal de ser identificats posteriorment, indicant el camp del mostreig, la data, segat o no segat i la part exacta de camp.

### **3.2.2. Cria d'*Hypera postica***

Es van dur a terme dues cries d'*H. postica*, una en massa, amb altes quantitats d'individus dins del mateix recipient, i una altra individualitzada. La cria massiva es va fer abans d'iniciar el present treball de recerca per ser utilitzada en experiments de



laboratori i fer les extraccions de l'ADN amb la finalitat d'identificar el gen d'interès buscat. La individual, específica per al present treball, es va fer per veure el desenvolupament d'aquest insecte dia a dia. Els resultats d'aquesta cria individual són els que es mostren a l'apartat de Resultats i Discussió.

### 3.2.2.1. Cria massiva

La cria, una vegada capturats els adults al camp, es va fer al laboratori, en condicions ideals, que són: temperatura de 20°C, humitat del 50-70% i un fotoperíode de 8:16 (llum/foscor).

Els primers adults agafats al camp segueixen el seu cicle vital. Posen ous a les tiges de l'alfals. Aquests evolucionen als estadis L1, L2, L3, L4, pre-pupes, pupes i finalment adults, que s'anomenaran **F1** i passaran a ser la nova generació, que és la que s'utilitza per a l'extracció de l'ADN i identificació del gen.

El procés concret de cria al laboratori va consistir en aparellar els adults en un pot gran de vidre (30-50 individus per pot), on van posar els ous a les tiges de l'alfals, aquests es van recollir amb les respectives tiges. Cada grup d'ous es va dipositar en una capsa de plàstic amb les dates de posta amb el seu respectiu menjar: dos o tres tiges d'alfals en un tubet amb aigua segellat amb paper de film per mantenir-la verda i fresca fins al proper canvi (Figura 23). Aquest procés d'alimentació es va dur a terme dos cops a la setmana. A la cria massiva, els ous dels adults només es van treure un cop a la setmana.



**Figura 23.** Esquerra: pot amb adults d'*Hypera postica* capturats a camp per iniciar la cria. Dreta: capsas amb larves d'*H. postica* durant la cria i taula del control de creixement. (Font: Elaboració pròpia).

A l'hora de preparar l'alfals, es van esporgar unes quantes tiges tendres del cultiu controlat a l'hivernacle. Aquestes es van triar i preparar de manera que la tija va

quedar neta. Posteriorment es van remullar amb aigua i es van dipositar en una solució d'aigua i lleixiu al 3%, durant 10 minuts, per a que quedessin lliures de qualsevol agent extern. Finalment, es van tornar a mullar per eliminar el lleixiu.

Per dur a terme tots els passos de cria, es van haver d'agrupar les pupes en plaques petri segons les seves dates de pupació, i dipositar-les en una nevera (4°C), ja que viuen aproximadament uns 3-4 mesos en aquestes condicions. D'aquesta manera es poden anar reposant als pots d'adults i fent servir per altres experiments quan sigui necessari.

### 3.2.2.2. Cria individualitzada

Per dur a terme un control propi del desenvolupament d'*H. postica* es van agafar tiges d'alfals amb les postes de 24h de dos pots diferents d'aproximadament 60 adults de camp cadascun. Els ous obtinguts es van dipositar en una capsa amb un paper de filtre i unes gotes d'aigua per mantenir una certa humitat. Aquesta capsa es va mantenir en una cambra de cultiu aclimatada a 28°C, fotoperíode 8:16 (llum/foscor) i humitat 75% fins acabar l'experiment.

Diàriament es van controlar els insectes observant el seu estat i fase, si havien mudat o havien mort. Les larves es van alimentar amb unes quantes fulles d'alfals i es va anar anotant en una taula la fase en que es trobaven diàriament, tot indicant el dia de les mudes fins arribar a l'estat d'adult (Figura 24).



Figura 24. Esquerra: capsetes per la cria individual d'*Hypera postica*, el número indica l'identificador de cada individu. Dreta: seguiment amb lupa de l'estat de cada individu. (Font: Elaboració pròpia).

### 3.2.3. Identificació molecular

En el present treball es va partir d'una recerca en bases de dades internacionals, principalment del National Center for Biotechnology Information dels Estats Units (NCBI), realitzada per membres del Grup de Recerca Control Integrat de Plagues Agrícoles i Forestals (IPM) de la Universitat de Lleida. Aquesta recerca va servir per seleccionar la seqüència d'un gen que permetés aquesta diferenciació. Es van seleccionar un nombre reduït de gens, nuclears i mitocondrials, i es van dissenyar encebadors per l'estudi d'aquests gens en els nostres insectes. De tots els gens que varen presentar amplificació en les nostres mostres, es va seleccionar el gen utilitzat en aquest treball pràctic, per ser un dels més idonis per la diferenciació (veure apartat 3.2.3.3).

En concret, en el projecte de recerca es van dur a terme proves amb fragments de gens genòmics però van acabar presentant millors amplificacions els mitocondrials, degut a la seva especificitat en cada espècie, ja que només s'hereten via materna. Aquest es reproduceix per si mateix semi-automàticament quan la cèl·lula eucariota es divideix. L'organització del genoma mitocondrial presenta diferències significatives respecte al genoma nuclear: una mida petita, tenen absència d'introns i un percentatge molt elevat d'ADN codificant.

#### 3.2.3.1. Extracció d'ADN dels insectes estudiats

##### Preparació de mostres

Abans de començar l'extracció de l'ADN d'una mostra, aquesta s'ha de preparar seguint un protocol que es relaciona a continuació (Figura 25). En el present cas d'estudi, i amb l'objectiu de trobar diferències en les seqüències d'ADN que ens serveixin per diferenciar els dos tipus d'insectes, es va extraure l'ADN de 2 larves d'*H. postica* i de 2 adults de *Bathyplectes* sp.

- a) Amb unes pinces es van agafar les larves d'*H. postica* de la cria general al laboratori, i es van posar en eppendorfs diferents.
- b) Es van agafar els individus de *Bathyplectes* de mostres congelades, amb els puparis respectius al seu cantó per una identificació segura del *Bathyplectes* sp.



c) Es va agafar la mostra d'un adult sencer de cada espècie de *Bathypsectes* (*anurus* i *curculionis*), i es van posar en dos eppendorfs.

d) Un cop numerades totes les mostres, es van posar amb nitrogen líquid, ja que es tracta d'un mètode de congelació molt eficaç degut a que es produeix un efecte immediat i això fa que no hi hagi degradació de l'ADN.

e) Totes les mostres es van guardar al congelador de -80°C, per conservació.



Figura 25. Preparació de mostres per a l'extracció de l'ADN dels insectes estudiats. (Font: Elaboració pròpia).

## Procediment

A la Taula 4 s'indiquen les mostres de les quals es va fer l'extracció d'ADN.

Taula 4. Mostres seleccionades per fer l'extracció de l'ADN.

Codi utilitzat	Insecte	Fase
1	<i>Hypera postica</i>	Larva
2	<i>Hypera postica</i>	Larva
3	<i>Bathypsectes curculionis</i>	Adult
4	<i>Bathypsectes anurus</i>	Adult

El procediment va ser el següent (Figura 26):

a) Es va afegir a cada eppendorf de 2ml, 40  $\mu$ l de tampó d'extracció AP1 Lysing Buffer.



b) Amb un pistil estèril es van triturar els insectes dins l'eppendorf.



c) Amb la micropipeta, es va afegir a cada eppendorf 4  $\mu$ l de RNAsa. La RNAsa és un enzim que degrada l'ARN.



d) Es van incubar els eppendorfs al Termobloc durant 30 min a 65° C a 800 rpm.





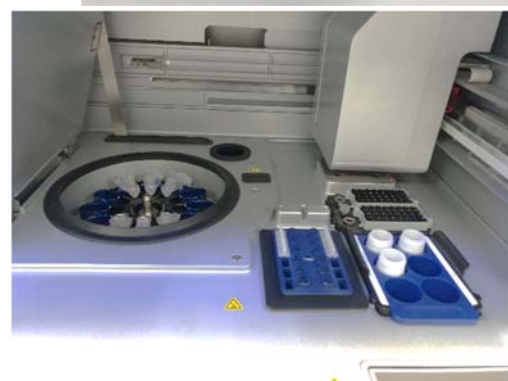
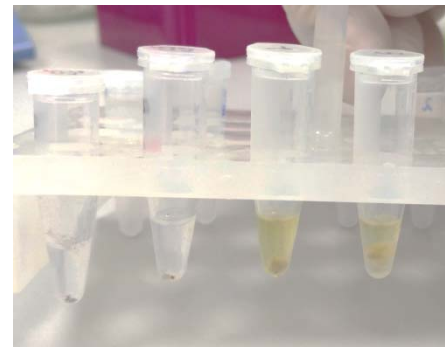
e) Es van afegir 130  $\mu$ l de buffer P3 i es van incubar 5 min amb el gel amb la finalitat de que precipitessin els residus (detergent, proteïnes, polisacàrids).

f) Es van centrifugar les mostres 5 min a 14000 rpm.

g) Un cop separades les dues fases, la líquida (on es troba l'ADN), de la sòlida (on es torben els residus), es va recollir la fase líquida amb una pipeta i es va transferir a un altre eppendorf (1,5 ml) numerat.

h) Es van preparar les mostres per ficar-les a la màquina QIAcube en un cistell que s'anomena rotor adapter. Aquest consta de tres tubs: en el primer tub es situa el DNeasy Mini spin column, en el segon, que és de color lila, hi va el QIAshedder spin column i en el tercer la mostra d'ADN que es troba en el eppendorff (1,5 ml).

i) Es van disposar els 4 rotor adapters a la màquina i es van omplir els buffers corresponents (1-buffer AN1, 2-buffer AN2, 3- buffer AE). Es van treure els marcadors de manera que només van quedar els de les quatre mostres disposats de la manera que indicaven les instruccions de la màquina i va començar el procés.



- j) Es van esperar 40 min (el cicle de la màquina descrit a baix) i es van obtenir les mostres que posteriorment es van quantificar.



**Figura 26.** Procediment per a l'extracció de l'ADN dels insectes estudiats. (Font: Elaboració pròpia).

Cicle de la màquina:

- Les mostres es lisen a l'agitador orbital, que pot ser escalfat si el protocol ho requereix.
- Cada lisat es transfereix a una columna de gir en un rotor adaptador. Si el lisat s'ha homogeneïtzat, primer es transfereix a la posició mitjana del rotor adaptador.
- Els àcids nucleics s'uneixen a la membrana de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) o resina de purificació de la columna de gir QIAGEN i són rentats per eliminar contaminants.
- La columna de gir es transfereix a un tub de microcentrífuga per a l'elució (separació) dels àcids nucleics purificats.

### **3.2.3.2. Quantificació de l'ADN extret**

La quantificació es va dur a terme mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Figura 27). El procediment va ser el que es detalla a continuació:

- Es va iniciar el sistema amb l'opció de mesurament de mostres d'àcids nucleics.
- Es van rentar les lents (base i tapa del NanoDrop) amb aigua.
- Es va dipositar 1  $\mu\text{l}$  d'aigua i es va fer el blanc. Fer el blanc consisteix a fer una primera mesura amb una gota d'aigua estèril per calibrar l'aparell.

- d) Es va dipositar 1  $\mu\text{l}$  de mostra amb una micropipeta en l'aparell i es va mesurar l'absorbància. L'aparell directament va donar una mesura de la concentració en  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
- e) Es va netejar la base entre mostra i mostra amb un tros de paper.
- f) Els resultats referents als mesuraments van quedar guardats en el sistema informàtic.



Figura 27. Quantificació de l'ADN amb el aparell NanoDrop 1000. (Font: Elaboració pròpia).

### 3.2.3.3. Amplificació d'un gen per PCR

Prèviament s'han de dissenyar els encebadors i encomanar-los a empreses específiques especialitzades en aquest tema (Sigma-Aldrich). Per dissenyar-los es va utilitzar una seqüència d'*H. postica* i una seqüència de *Bathypsectes sp.*, seleccionant una zona diferent d'aquests per tal que la seva regió amplificada no coincidís. Com s'ha esmentat abans, es va fer una recerca a la base de dades del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), on es poden trobar seqüències de gens, ADN, ARN, etc.

En concret, per al cas de la seqüència d'*H. postica* es va partir de la seqüència parcial del gen KX372667.1 trobada a la base de dades NCBI: *H. postica* isolate Hp2678Cz 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (Tuda et al., 2016). La seqüència és la que es mostra a continuació.



**KX372667.1:**

```

1   aactaactag gattccctca gtagctgcga gcgaacaggg aagagcccag caccgaatcc
61  gcggccgat accggacgcc gggaaatgtg gtgttaggga ggggtccatta tcccagatc
121 atgcggtgcg tccaagtcct tctgaacgg ggccacagcc catagagggt gccaggcccg
181 tagtgaccgc tgctgatcgc gggaggatct ctctcagag tcgggttgct tgagagtga
241 gccctaagtg ggtggtaaac tccatctaag gctaaatatg accacgagac cगतagcgaa
301 caagtaccgt gagggaaagt tgaagacac ttgaagaga gattcaaga gtacgtgaaa
361 ccgttaggg gtaaactga gaaacccgaa aggtcgaagg gagaaattca ttcggtttc
421 gccgttgcg tgagacggc gtgtgacggg gaacgttcgc gtaaccgca cttccgttt
481 ttcgatccga tagcgaacgt gtgcactttt ctctggtag gacgtcgca tccgttggt
541 gtcggtctac ggctcatggt ggagccccta gtacggctt gccgttacgt gcggaccgt
601 gtgtcctggc tgactgctc gacgtatac gaaaggttta aggccgtct ttgacgttc
661 gactcgtac aagcgcgtc gatgtgttg cgatcggacc tgggccggt tctgacctt
721 ggcgactgt ggctcgatg ttctgaaca gaccttgac cgatctgca cgctatagct
781 ttgggtactt tcaggaccg t

```

Els encebadors van ser dissenyats per investigadors del grup de recerca amb un programa disponible a la mateixa web de la NCBI. La regió seleccionada que es vol amplificar per PCR, d'aproximadament entre 600 i 650 bp (parells de bases), forma part d'un gen, que codifica per un enzim anomenat citocrom C oxidasa (COI), present en el mitocondri. Els encebadors, nombrats EF-1 $\alpha$ , utilitzats per aquesta amplificació van ser un *forward* i un *reverse*, dissenyats en base als criteris mencionats (seqüència no publicada). Tots dos es sintetitzen en la direcció 5'- 3'.

**Preparació dels encebadors**

Els encebadors es van encarregar a l'empresa Sigma-Aldrich i van arribar liofilitzats (secs). A l'arribar es van diluir amb H<sub>2</sub>O miliQ per aconseguir una concentració de 100  $\mu$ M.

Per a la dilució dels encebadors es va aplicar la fórmula següent.

$\text{Volum inicial} \times \text{Concentració inicial} = \text{Volum final} \times \text{Concentració final}$
---

Es va treballar a 10 mM. Així, es va fer una dilució dels tubs originals: 10  $\mu$ l de l'encebador original + 90  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ. Els eppendorfs es van marcar amb el nom del l'encebador i la concentració (10 mM). Un cop fetes les dilucions, es van congelar -20°C.

**Preparació d'una reacció de PCR**

- a. En un tub eppendorf d'1,5 ml es va preparar una barreja (Master Mix) per les mostres. Com que es van fer 4 reaccions, es va preparar una Master Mix per a 5

mostres, pels possibles errors de pipeteig. Les quantitats de cada component de la Master Mix s'indiquen a la Taula 5.

Taula 5. Components de la Master Mix amb les quantitats calculades per 1 mostra (X1) i per les 5 mostres (X5).

Components		X1 (µl)	X5 (µl)
H2O		9,5	47,5
Taq RED Master Mix	Tampó 10x		
	dNTPs	9,5	47,5
	Taq polymerase		
Primer Forward 10µM		2,5	12,5
Primer Reverse 10µM		2,5	12,5
cADN (50ng/µl)		1	5
<b>Total</b>		<b>25</b>	<b>125</b>

- La Master Mix es va agitar amb un vòrtex molt lleuger per barrejar tots els components. Pot ocórrer que part de la barreja quedi adherida al tap del tub. Per tal que tota la barreja quedi al fons, es poden uns copets al tub o, en últim cas, es fa un puls de centrífuga.
- Es van preparar les gradetes amb els tubs eppendorf PCR (0.2ml) per a cada mostra i es van marcar els tubs i les tapes amb un codi amb retolador.
- Un cop preparat la Master Mix, es van ficar 24 µl del mix a cada eppendorf (Figura 28) i seguidament es va afegir 1µl de cADN de cada mostra a cada tub eppendorf.

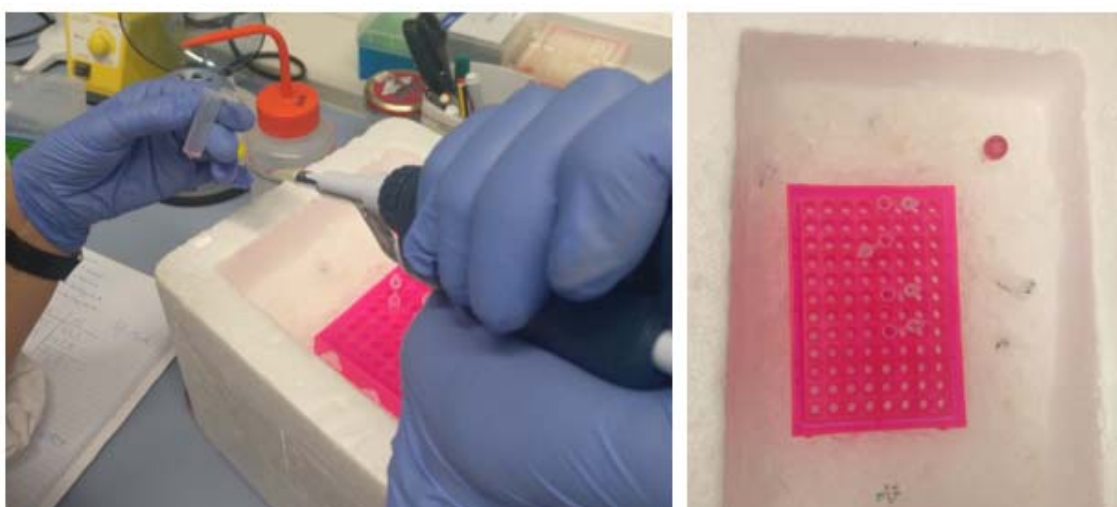


Figura 28. Fase per a la preparació de PCR: Afegir 24ul del mix a cada eppendorf. (Font: Elaboració pròpia).

- Els tubs eppendorf es van col·locar en el termociclador (Figura 29).

- f. Es va executar el programa de temperatura i cicles que prèviament s'havien gravat per aquest experiment (Taula 6).



Figura 29. Programa executat (detallat a la Taula 6) i col·locació dels eppendorfs al termociclador. (Font: Elaboració pròpia).

Taula 6. Programa utilitzat al termociclador de preparació de les mostres per a l'electroforesi.

	Etapas PCR				
	1		2		3
Temperatura (°C)	95	94	57	68	4
Temps	1'	30''	30''	1'	∞ (fins posar al congelador)
Nombre cicles	1		35		

Un cop acabat el programa, les mostres es van guardar al congelador a -20 °C i així ja van estar preparades per l'electroforesi.

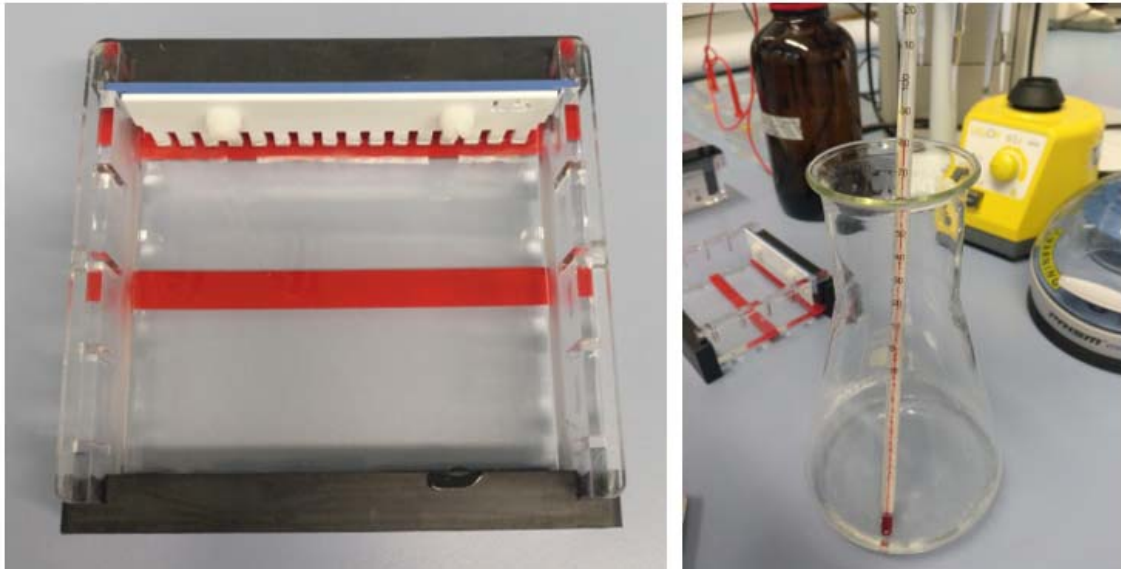
#### 3.2.3.4. Electroforesi en gel d'agarosa

**Preparació del gel d'agarosa:** Prèviament a l'electroforesi, es va dur a terme la preparació del gel d'agarosa. Aquest gel va ser a l'1,5%, i va estar compost per 1,5 g d'agarosa en 100 ml de tampó TAE 1X. En aquest cas 50 ml TAE1X + 0,75 g d'agarosa (Figura 30).



**Figura 30.** 1a) TAE 1x reciclat, aquest s'utilitza per omplir la cubeta d'electroforesi. 1b) TAE 1x nou, aquest s'utilitza per fer el gel d'agarosa. 2) 0,75g d'agarosa per fer el gel d'agarosa. (Font: Elaboració pròpia).

Per a la seva preparació es va escalfar la mescla al microones una vegada ben barrejada, fins arribar a ebullició, punt en què l'agarosa es dissol. Un cop treta la mescla del microones, es va mesurar la temperatura amb un termòmetre i es va esperar fins que arribés a 60 °C. Un cop va arribar a aquesta temperatura, es va afegir 5 µl de *Save View*, que es tracta d'un marcador d'àcids nucleics. Aquest producte és un agent capaç d'intercalar-se entre les bases nitrogenades de l'ADN i quan s'il·lumina amb llum UV emet fluorescència. Per tant, permet detectar la mostra d'ADN en forma de banda fluorescent. El *Save view* substitueix a l'ús de bromur d'etidi, que és el colorant que s'ha fet servir tradicionalment, ja que és tracta d'un reactiu molt tòxic, tot i ser més barat. El gel, encara en estat líquid es va posar en una cubeta prèviament amb el corresponent pinte, per un cop solidificat, carregar les mostres i el marcador molecular en els pous determinats (Figura 31).



**Figura 31.** Gel d'electroforesi amb el pinte per fer els pous de càrrega. Gel líquid a una temperatura de 80°C. (Font: Elaboració pròpia).

**Electroforesi:** L'electroforesi es va realitzar en gel d'agarosa al 2% TAE. El procediment va ser el que es descriu a continuació.

#### Preparació tampó d'electroforesi TAE 1x:

El tampó es va fer per dilució del tampó TAE 10X. Es tracta d'una solució d'elevada conductància elèctrica la qual permet la mobilitat electroforètica de l'ADN a través del gel. La composició del tampó va ser la següent:

- 108 g TRIS
- 55 g àcid bòric
- 40 ml EDTA 0,5M Ph8
- Afegir aigua milliQ fins 1L

Un cop preparat el tampó 10x, es va autoclavar per evitar la seva contaminació.

#### Preparació de les mostres:

Per carregar les mostres d'ADN al gel, es va afegir a cada mostra 3 µl de tampó de càrrega 6x. Aquest tampó augmenta la densitat de la mostra, per tant provoca la caiguda uniforme de les mostres als pous del gel i permet visualitzar la mostra al carregar-la ja que té color blau. La composició d'aquest tampó és la següent:

- 3 ml de glicerol
- 7 ml TEpH8
- Un polsim de blau de bromofenol.

#### Preparació del sistema d'electroforesi:

Abans de carregar el gel, es va afegir tampó d'electroforesi TAE 1x a la cubeta fins cobrir el gel completament. D'aquesta forma, es crea un ambient amb carrega iònica que permet que es condueixi el corrent elèctric i, a més a més, es protegeix la integritat de l'ADN, ja que el tampó té pH 8.

Després, es va carregar el gel amb 12  $\mu$ l de cada mostra. Al primer i a l'últim pou es van carregar 5  $\mu$ l de marcador de pes molecular 1 Kb. Aquest marcador és una barreja comercial de fragments d'ADN de pes molecular conegut de fins 1 Kb, que serveix com a referència per valorar la mida dels fragments d'ADN de la mostra. Posteriorment, es va col·locar la tapa a la cubeta i va connectar el sistema a la font d'alimentació amb les següents condicions: 100 V, 136 mA (Figura 32). Es va deixar córrer l'ADN durant 1 hora.



**Figura 32.** Cubeta d'electroforesi connectada al corrent elèctric. Condicions del sistema de corrent elèctric per fer córrer l'ADN pel gel d'agarosa. (Font: Elaboració pròpia).

#### Visualització de les bandes d'ADN al gel d'agarosa:

Per detectar les bandes d'ADN que es van separar en l'electroforesi, es va observar el gel d'agarosa a través de llum ultraviolada (UV), ja que el colorant utilitzat (*Safe View*) emet fluorescència quan està intercalat entre les bases d'ADN, específicament en la regió vermella-taronja de l'espectre, quan s'exposa a la llum UV.



El gel es va col·locar en el visualitzador de gels Geldoc XR+ (Figura 33) i es va il·luminar amb llum UV. El gel il·luminat es va visualitzar a la pantalla de l'ordinador connectat al Geldoc XR+. A la imatge generada, es van poder observar les bandes d'ADN, ja que emeten un senyal fluorescent que destaca en un fons gris.



**Figura 33.** Gel d'agarosa amb l'ADN corregut col·locat en el visualitzador de gels Geldoc XR+. (Font: Elaboració pròpia).

#### **3.2.4. Entrevista a un expert del sector productiu de l'alfals**

Com a complement al treball de recerca es va realitzar una entrevista a un expert del sector de la producció i deshidratació d'alfals a la zona de Lleida i Osca. Prèviament es va fer una cerca de diferents empreses dedicades al cultiu, assecatge i comercialització de l'alfals. Per la seva dimensió i àmbit de treball, es va seleccionar l'empresa Nafosa, que és una indústria amb seu central a Esplús (Osca), però que disposa d'un total de 5 plantes: 3 a la província d'Osca (Esplús, Montsó, Peralta d'Alcofea), 1 a Navarra i una altra a Bahía Blanca (Argentina). D'aquesta empresa es va contactar i entrevistar al seu responsable tècnic, l'Enginyer Agrònom Sr. Antonio Sopena. L'entrevista, recollida a l'annex del present treball, es va realitzar el 27/07/2019.

Aquesta entrevista va servir per conèixer de més a prop el cicle productiu de l'alfals, les plagues que li afecten, la seva importància en quan a disminució de rendiments, els tractaments que es realitzen, així com aspectes del processament en plantes de deshidratació i comercialització de l'alfals.

Els resultats de l'entrevista estan integrats en diferents parts del treball, principalment a la introducció i en la discussió de resultats.

## 4. Resultats i Discussió

### 4.1. Cria individualitzada d'*Hypera postica*

Com a resultat de la captura d'insectes a camp realitzada a la primavera, es va fer una cria massiva a partir d'adults d'*H. postica* (descrita a l'apartat de Material i Mètodes) i es van reservar pupes en plaques petri (mantingudes en nevera a 4 °C). Més tard (juliol de 2019), i en condicions normals de temperatura, van néixer adults a partir d'aquestes pupes per fer la cria individualitzada específica del present treball.

Aquesta cria individualitzada va començar el 31/07/2019, moment de la posta dels ous resultant de l'aparellament dels 60 adults seleccionats de la cria massiva. D'aquest aparellament es van agafar 35 ous, dels quals en van néixer 20 al cap de 6 dies. Aquest número es va considerar suficient per a tirar endavant la cria i veure tot el cicle evolutiu de l'insecte.

A la Taula 7 es fa un detall del seguiment dels diferents individus de la cria, el qual es mostra també gràficament a la Figura 34.

Del total de les 20 larves que van néixer, 16 (80 %) van completar el primer estadi L1, 13 (65 %) el segon L2, 13 (65 %) el tercer L3 i 9 (45 %) el quart i últim estadi L4 abans de l'estat de pre-pupa. Aquests nous individus van arribar tots fins a l'estat d'adult. Així, del total de 20 larves inicials, els adults resultants van ser 9, la qual cosa suposa un percentatge d'èxit del 45 %.

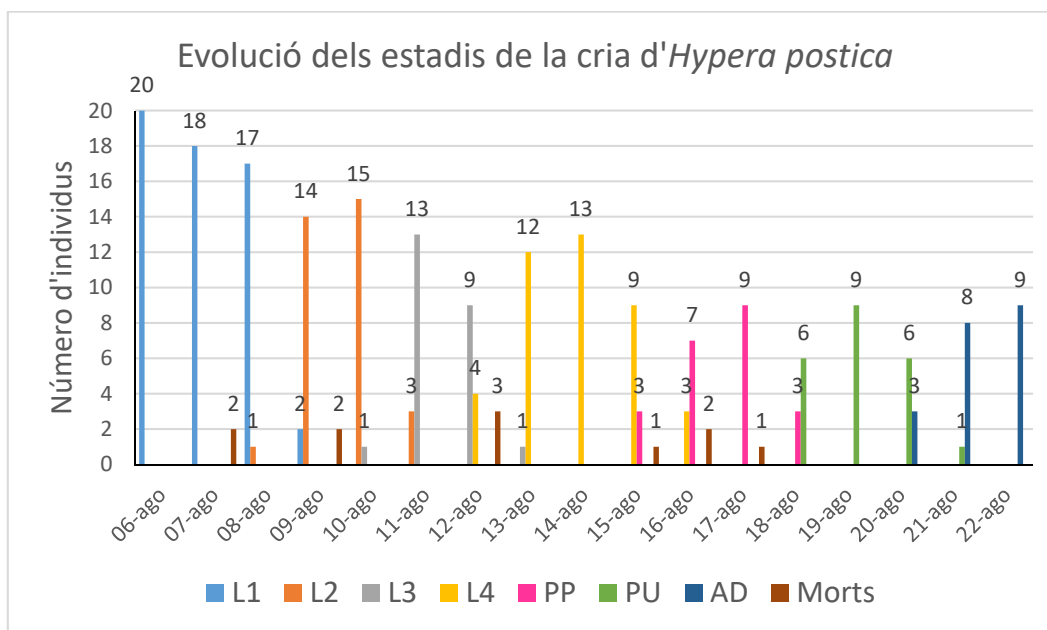


Figura 34. Evolució dels estadis de la cria individualitzada d'*Hypera postica*. L1: primer estadi de larva, L2: segon estadi, L3: tercer estadi, L4: quart estadi, PP: pre-pupa, PU: pupa, A: Adult. Font: Elaboració pròpia.



Taula 7. Recompte de l'estat de les larves de la cria individualitzada d'*Hypera postica*. Les dates són d'agost de 2019.

DATA/ IND	6/8	7/8	8/8	9/8	10/8	11/8	12/8	13/8	14/8	15/8	16/8	17/8	18/8	19/8	20/8	21/8	22/8
1	L1	L1	L1	L1	L2(M)	L2	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	L1	L1	L1	L1	L2(M)	L2	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	PP	PP	PP	PU	PU	A	A	A
4	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L2	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L4(M)	L4	L4	PP	PP	PP	PP	PU	A	A	A
6	L1	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4 (M)	L4	L4	PP	PP	PU	PU	PU	A	A
8	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L3	L4(M)	L4	L4	PP	PP	PU	PU	PU	
9	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L4(M)	L4	L4	L4	PP	PP	PU	PU	PU	A	A
10	L1	L1	L1	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	L4	Morta	-	-	-	-	-
12	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	PP	PP	PP	PU	PU	A	A	A
13	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	Morta	-	-	-	-	-	-	-
14	L1	L1	L1	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L4(M)	L4	L4	L4	Morta	-	-	-	-	-	-
16	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	PP	PP	PP	PU	PU	A	A
17	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	L4	PP	PU	PU	PU	A	A
18	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	Morta	-	-	-	-	-	-
19	L1	Morta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	L1	L1	L1	L2(M)	L2	L3(M)	L3	L4(M)	L4	L4	PP	PP	PU	PU	PU	A	A
Vives	20	18	18	16	16	16	13	13	13	12	10	9	9	9	9	9	9
GD <sup>1</sup> °C	133,2	152,3	171,4	190,5	209,6	228,7	247,8	266,9	286,0	305,1	324,2	343,3	362,4	381,5	400,6	419,7	438,8
GD <sup>2</sup> °C		154			218		260		304								454

L1: primer estadi de larva, L2: segon estadi, L3: tercer estadi, L4: quart estadi, (M): ha mudat aquest dia, PP: pre-pupa, PU: pupa, A: Adult. GD<sup>1</sup>: Graus Dia d'aquest estudi. GD<sup>2</sup>: Graus Dia de referència segons Brewer et al. (2008).

Hi ha pocs estudis sobre la dinàmica de poblacions d'*H. postica* amb els quals comparar els resultats obtinguts en el present treball. Un dels més significatius és el de Kuhar et al. (2000), que tracta sobre la dinàmica i els factors de mortalitat en camps d'alfals de Virginia (USA). Aquests investigadors van fer un recompte de les larves que havien arribat a l'estat L2 i a l'estat L4 per als diferents camps d'alfals mostrejats. Els percentatges d'èxit fins a L2 van estar entre el 27,9 i el 55,1 %, amb una mitja de 42,8 %, Mentre que la taxa fins a l'estat L4 va variar entre el 20,6 i el 41,3 %, amb una mitja de 30,9 %. En el present estudi les taxes d'èxit han estat majors, amb el 65% de les larves que van assolir l'estat L2 y el 45 % que va arribar a L4.

Aquestes diferències poden ser degudes a que el present cas s'ha fet una cria controlada, en condicions homogènies de temperatura, i en les que les larves no s'han vist afectades per parasitoides com a *Bathyplectes* sp., que sí es dona en condicions naturals, o altres depredadors. Malgrat això, sí que hi ha hagut algunes morts per infeccions, segurament causades pel fong *Zoopthora phytonomi* (Zahiri et al., 2014). Uns altres autors, Gooyer et al. (1995, en Zahiri et al., 2014), també van comprovar que la mort per *Z. phytonomi*, va ser un dels principals reguladors de la població d'*H. postica* en camps d'alfals.

Un altre resultat que s'ha comparat ha estat l'evolució dels individus d'*H. postica* d'acord als graus dia (GD) acumulats, ja que necessiten certa temperatura per anar completant els diferents estadis. Conèixer això és important per predir quan poden néixer les larves o poden passar a altres estadis com a resposta a l'augment de les temperatures. Segons Brewer et al. (2008), per l'alfals, els graus dia s'acumulen per cada període de 24 hores que les temperatures pugen per sobre dels 8,9 °C a partir de l'1 de març (per les condicions de Wyoming, USA)<sup>1</sup>. Així, segons aquest estudi, per arribar a L1 es requereixen uns 154 GD, a L2 218 GD, a L3 260 GD, a L4 304 GD i 454 GD per a l'emergència d'adults.

En el present estudi, atès que la temperatura durant la cria ha estat constant (28 °C), es pot dir que cada dia s'han acumulat 19,1 graus dia. A la Taula 7 es mostren els GD acumulats per a cada estadi i es comparen amb els de Brewer et al. (2008). En el nostre cas l'acumulació de GD es va comptar des de la posta d'ous (31/07/2019). L'aparició dels diferents estadis coincideix, en línies generals, amb les del treball de Brewer et al. (2008), encara que són mínimament més baixes. Això pot ser degut a que en condicions naturals pot haver més variació de la temperatura diària que no la que hi ha hagut a la cria controlada.

El seguiment de l'evolució de les larves de la cria fins a l'estat d'adult es mostra a la Figura 35.

---

<sup>1</sup> Els graus dia per al cas de l'alfals es calculen com [(Temperatura màxima diària – Temperatura mínima diària)/2 – 8,9]. Brewer et al. (2008).

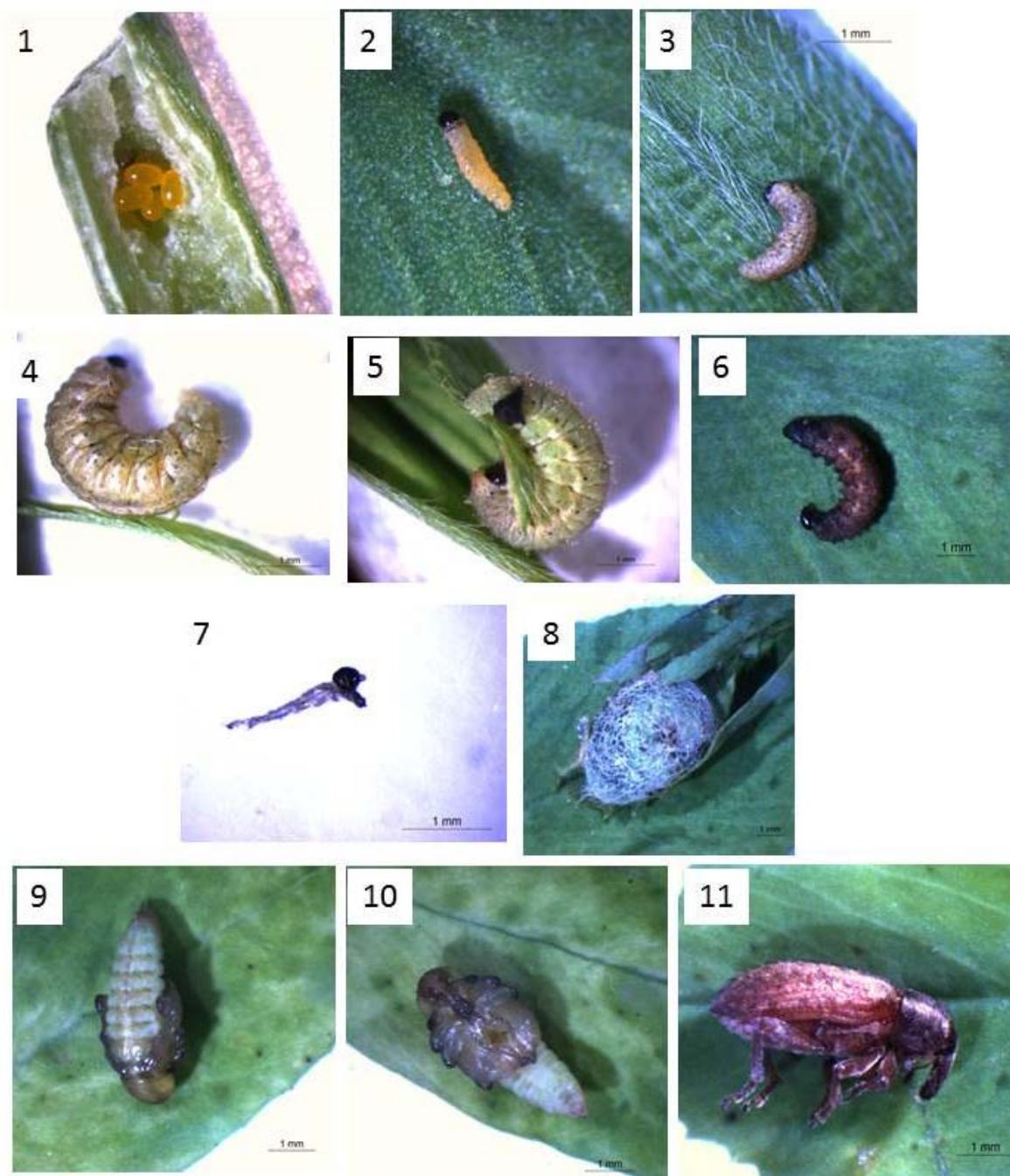


Figura 35. Fases del cicle biològic d'*Hypera postica* resultat de la cria controlada duta a terme en aquest estudi. 1) Posta d'ous dins de la tija d'alfals. 2) Larva en fase L1. 3) Larva en fase L2. 4) Larva en fase L3. 5) Larva en fase L4. 6) Larva morta. 7) Muda de canvi de fase. 8) Pre-pupa. 9) Pupa (vista dorsal). 10) Pupa (vista abdominal). 11) Adult. (Font: Elaboració pròpia).

## 4.2. Extracció i quantificació d'ADN

A partir de les larves d'*H. postica* i adults de *Bathypsectes* sp. es va fer l'extracció i la quantificació de l'ADN segons la metodologia exposada a l'apartat 3.2.3.

Les quantitats d'ADN obtingudes a partir de les mostres analitzades van oscil·lar entre 19,7 i 34,6 ng/μl. (Taula 8). Segons els resultats de les lectures, les quantitats obtingudes són correctes, tot i que generalment utilitzant aquest mètode amb material vegetal s'obtenen quantitats més elevades, com per exemple 110-851 ng/μl en plantes del gènere *Solanum* (Cadavid et al., 2013) o 1570 ng/μl trobats per Juárez (2018) en plantes de blat de moro. En el present cas d'estudi, al tractar-se d'insectes, un dels problemes principals es deu a que l'exosquelet de quitina necessita més temps per degradar-se durant el procés de lisis cel·lular, afectant així a les concentracions d'ADN finals.

A l'hora d'enfrontar una extracció d'ADN d'un insecte s'ha d'escollir un mètode que minimitzi al màxim la degradació de l'ADN durant el procés, ja que en fragmentar l'exosquelet de quitina, els teixits..., l'ADN queda exposat a l'acció d'enzims que el poden degradar o destruir, reduint-se el rendiment obtingut en aquest procés.

El mètode basat en AP1 Lysing Buffer exposat en aquest treball està optimitzat per evitar aquesta degradació.

**Taula 8.** Quantitat d'ADN extret de cada mostra i valors de puresa de l'ADN obtingut a partir de les absorbàncies a 260 i 280 nm).

Codi utilitzat	Insecte	Quantitat ADN obtingut (ng/ul)	Puresa ADN		
			A260	A280	260/280
1	<i>Hypera postica</i>	34,6	0,693	0,366	1,89
2	<i>Hypera postica</i>	24,3	0,485	0,271	1,79
3	<i>Bathypsectes curculionis</i>	19,7	0,394	0,172	2,29
4	<i>Bathypsectes anurus</i>	28,8	0,575	0,262	2,20

Sempre que es fa una extracció d'ADN, aquest es troba unit a ARN, proteïnes i a altres substàncies aromàtiques. Tot i que en els protocols d'extracció es fan passos per tal d'eliminar-los, és necessari estudiar la puresa d'aquest ADN per assegurar-se que el protocol d'extracció ha estat correcte i l'ADN és vàlid per a continuar l'estudi.

Per avaluar aquest aspecte, es va calcular el quocient d'absorció A260/A280 (Desjardins i Conklin, 2010). Amb aquest quocient es veu el possible contingut en proteïnes de la mostra. La relació A260/280 és molt estable i es considera que un ADN de puresa òptima té un valor entre 1,8-2,2. Un ADN de puresa acceptable ha de tenir almenys una relació A260/280 > 1,6. Un valor A260/280 < 1,8 indica una possible

contaminació per compostos aromàtics com fenols i proteïnes. Un rati  $A_{260}/A_{280} > 2,3$  podria ser degut a la presència d'ARN a la mostra. En el present cas d'estudi, el rati  $A_{260}/A_{280}$  es va situar entre 1,79 i 2,29 (Taula 8), la qual cosa indica que l'ADN extret de les mostres dels insectes va ser òptim per a continuar amb l'experiment de diferenciació del gen.

A mode d'exemple, a la Figura 36 es mostra l'espectre d'absorció de l'ADN extret de la mostra de *B. curculionis*, on es pot comprovar que el màxim d'absorció de l'ADN es dona a una longitud d'ona de 260 nm. Això es degut a que els nucleòtids que componen l'ADN tenen màxims d'absorció al voltant d'aquesta longitud d'ona.

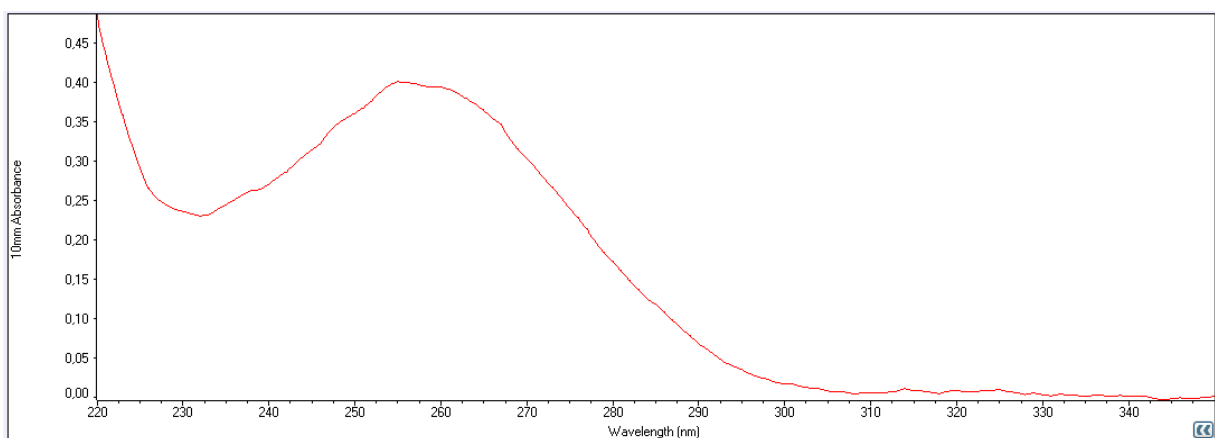
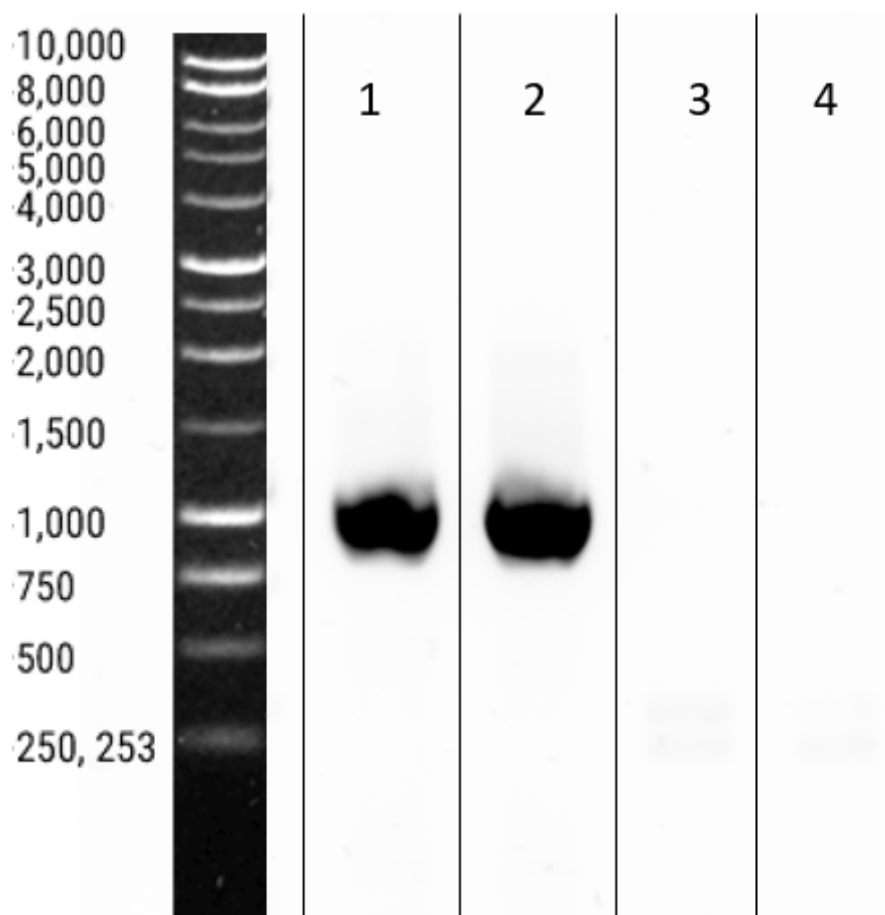


Figura 36. Absorbància de la mostra d'ADN de *Bathyplectes curculionis*. (Font: Elaboració pròpia).

### 4.3. Amplificació amb l'encebador EF-1 $\alpha$

Els resultats de l'amplificació en *H. postica* i en les dues espècies de *Bathyplectes* sp. es mostren a la Figura 37. En aquesta figura es mostra com la seqüència seleccionada està present en *H. postica*, ja que es va obtenir una banda d'amplificació de 950 bp només en aquesta espècie (mostres 1 i 2 del gel d'agarosa), mentre que en les mostres 3 i 4 de *Bathyplectes* sp. no apareix aquesta banda d'amplificació. Això es deu a que la seqüència seleccionada per dissenyar els encebadors que amplifiquen pel gen d'interès presenten una baixa homogeneïtat, quan es comparen les dos espècies.



**Figura 37.** Resultat de l'electroforesi dels productes d'amplificació del gen d'interès en *H. Postica* i en *Bathyplectes* sp. Els números de les columnes indiquen el codi de la mostra carregada en cada carril: 1 i 2: *Hypera postica*; 3 i 4: *Bathyplectes* sp. A l'esquerra es veu el patró de bandes del marcador de pes molecular (1 Kb) tot indicant el número de parells de bases (bp). (Font: Elaboració pròpia).

Tal com mostra la Figura 37, la identificació d'*H. postica* a partir de la tècnica PCR amb l'encebador EF-1  $\alpha$  ha donat bons resultats. No s'han trobat altres treballs amb els que comparar aquests resultats en *H. postica*, encara que sí en la identificació de parasitoides himenòpters en altres plagues com a *Cydia pomonella* i *Grapholita molesta* (Frank et al., 2017). Aquests autors van trobar que la identificació molecular dels nivells de parasitoidisme en poblacions naturals de *C. pomonella* amb encebadors específics no hi ha diferència respecte les estimacions tradicionals basades en la cria d'eruga i en la identificació morfològica posterior. En aquesta investigació, Frank et al. van tractar d'identificar el parasitoidisme amb la tècnica de PCR-RFLP amb encebadors universals (no específics). Van trobar que també era molt útil en la identificació dels parasitoides adults però no en identificar les larves de *C. pomonella* parasitades pels himenòpters. Això, vol dir que la tècnica utilitzada en el present treball de recerca (PCR amb encebadors), encara que aquí no s'ha utilitzat per identificar les larves d'*H. postica* parasitades per *Bathyplectes* sp., podrà ser també útil quan es tracti de fer aquesta identificació.

L'ús d'aquestes tècniques és molt important per al control biològic de les plagues, ja que es requereixen eines molt específiques per identificar amb precisió els enemics naturals i conèixer el nivell de parasitoidisme per prendre mesures de control (Agustí et al., 2005). Això, està sent cada vegada més possible degut a la ràpida expansió i disponibilitat pública de seqüències d'ADN, en bases de dades científiques com la NCBI utilitzada en aquest treball per la selecció de la seqüència d'*H. postica*.

#### **4.4. Visió del sector productiu de l'alfals**

La visió del sector productiu és la que s'ha extret de l'entrevista realitzada al Sr. Antonio Sopena, Enginyer Agrònom i responsable tècnic d'una gran empresa productora i transformadora de l'alfals. Aquesta entrevista es recull a l'annex del treball.

Els resultats més destacats de l'entrevista es poden resumir en els següents punts:

- a) La cuca verda és una plaga que, actualment, causa grans problemes al primer tall anual de l'alfals. Aquesta plaga ha passat en pocs anys de ser un insecte esporàdic en la zona productora de la Vall de l'Ebre a ser una de les principals plagues.
- b) El control d'aquesta plaga i en general de totes les del cultiu passa pel control integrat. És molt important no eliminar els enemics naturals, ja que moltes vegades els tractaments fitosanitaris no són efectius i les plagues es descontrolen.



## 5. Conclusions

### 5.1. Científiques

La principal conclusió científica del present treball de recerca és que la utilització d'eines de biologia molecular, com l'extracció d'ADN, amplificació amb PCR i encebadors específics, ha permès diferenciar *H. postica* de *Bathyplectes* sp., ja que la zona que amplifica per l'insecte diana, *H. postica*, no està en *Bathyplectes* sp.

Els resultats obtinguts representen un primer pas en la diferenciació molecular d'*H. postica* respecte el seus parasitoides *Bathyplectes* sp., el qual és necessari per millorar el coneixement del grau de control de la plaga que poden exercir aquests parasitoides en camps d'alfals.

Altres **conclusions específiques** són:

#### Sobre la cria en cambra de cultiu d'*H. postica*:

- La cria controlada d'*H. postica*, necessària per poder disposar d'individus (en aquest cas larves) lliures de paràsits, va donar taxes d'èxit més altes que en condicions naturals (segons altres estudis consultats). Això pot ser degut a l'absència de parasitoidisme i a les condicions de temperatura controlades en la cria.
- El desenvolupament dels diferents estadis de l'insecte va seguir el patró d'evolució segons els graus dia acumulats. Això és important des del punt de vista del seguiment amb precisió de l'evolució de la plaga a camp per poder prendre decisions sobre el seu control.

#### Sobre la tècniques moleculars utilitzades:

- La tècnica d'extracció de l'ADN va permetre obtenir mostres de suficient concentració i puresa per dur a terme la PCR amb encebadors específics.
- La PCR va amplificar el gen d'interès per a *H. postica*, visualitzat posteriorment en el gel d'agarosa després d'aplicar la tècnica d'electroforesi.

### Sobre la visió del sector productiu de l'alfals:

- El sector de l'alfals considera el control integrat com la clau per a controlar *H. postica*. En els últims anys, aquesta plaga s'ha convertit en un dels principals problemes fitosanitaris del cultiu, que pot arribar a causar importants pèrdues econòmiques.

## **5.2. Personals**

La realització d'aquest treball m'ha servit per conèixer aspectes molt diversos sobre com portar a terme una investigació, formant part d'un equip de treball. Així, he vist diferents tipus de tècniques: des dels clàssics mostrejos d'insectes a camp fins a tècniques avançades utilitzades en l'àmbit de la biologia (extracció, quantificació, amplificació i electroforesi d'ADN). A més a més, he descobert el món de la cerca bibliogràfica a través de bases de dades científiques. Això m'ha permès ampliar el coneixement sobre molts aspectes teòrics i de tècniques que m'eren desconegudes.

He participat en una tasca molt concreta d'un gran projecte de recerca sobre un problema real, que està afectant un cultiu agrícola de gran interès a les nostres terres com és l'alfals. Encara que aquesta tasca hagi estat molt específica i sigui un primer pas, he pogut conèixer quin és el context general del cultiu de l'alfals a la Vall de l'Ebre, la seva importància, les plagues que l'afecten i les possibilitats actuals i tendències per al seu control biològic.

Per últim, el formar part d'un equip de treball també m'ha fet adonar que la recerca no és un treball individual, sinó que és un treball en equip, on cada persona posa el seu coneixement i esforç per assolir els objectius comuns buscats.

## **5.3. Continuació de les línies de recerca**

Com a continuació d'aquest treball, a partir de la banda amplificada de la seqüència d'interès d'*H. postica* identificada, el següent pas seria tallar-ho del gel d'agarosa, eluir-ho i netejar-ho, per després seqüenciar-ho. Després, s'hauran de dissenyar encebadors específics per amplificar aquesta nova seqüència, podent-se publicar la seqüència del gen d'interès per diferenciar *H. postica* de *Bathyplectes* sp. a les poblacions que es donen a la zona de la Vall de l'Ebre.

Posteriorment, s'haurà de trobar un gen que diferenciï l'ADN de *Bathyplectes* sp. respecte d'*H. postica*. Si s'aconsegueix, aquest gen també s'haurà de seqüenciar i dissenyar encebadors específics per amplificar-ho. D'aquesta manera es podrà saber amb una extracció d'ADN d'*H. postica* si està parasitada per *Bathyplectes* sp. o no. Amb

això es podran quantificar les taxes de parasitoidisme finals, tant a nivell de camp com a nivell de zona, per calcular l'impacte d'aquest insecte sobre les poblacions de la plaga. Aquests resultats podran servir per assessorar els agricultors sobre el control de la plaga, o bé sobre l'afectació esperada de la plaga a la campanya següent.

## 6. Bibliografia

- Achata J.A., Bundy C.S., Oesterle N., Hanson S.F., 2013. Phylogenetic Analysis of the Alfalfa Weevil Complex (Coleoptera: Curculionidae) in North America. Journal of Economic Entomology. 106(1), 426-436; <http://dx.doi.org/10.1603/EC12262>.

**Informació extreta: Antecedents sobre estudis moleculars d'*H. postica*.**

- Agustí N., Gabarra R., 2013. Recientes avances en la aplicación de técnicas moleculares al control biológico de plagas: de la PCR convencional a la secuenciación masiva. Phytoma España 254, 18-19.

**Informació extreta: Aplicacions de la biologia molecular en el control biològic de plagues.**

- Agustí N., Bourguet D., Spataro T., Delos M., Eychenne N., Folcher L., Arditi R., 2005. Detection, identification and geographical distribution of European corn borer larval parasitoids using molecular markers. Molecular Ecology 14, 3267–3274. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02650.x>

**Informació extreta: Discussió de resultats sobre la extracció i quantificació de l'ADN.**

- Almacelles J., Perdiguier A., 2007. Las plagas de la alfalfa y su control químico y biológico. Vida Rural, 04/2007, 22-26.

**Informació extreta: Generalitats de les plagues de l'alfals.**

- Álvarez J.M., Menalled F., Hoy M.A., 2005. Las herramientas moleculares en el control biológico. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 74, 4-11.

**Informació extreta: Importància de la biologia molecular en el control de plagues.**

- Brewer M.J., Legg D.E., Gray A.M., 2008. Alfalfa weevil biology and management. Cooperative Extension Service Bulletin B-983. University of Wyoming, USA, 10 pp.

**Informació extreta: Discussió de resultats sobre la cria d'*H. postica*.**

- Cadavid I.C., Rosero D.A., Uribe S.I., 2013. Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. Revista Colombiana de Biotecnología 15(2), 186-192.

**Informació extreta: Discussió de resultats sobre la extracció i quantificació de l'ADN.**

- Castañé C., Agustí N., Arnó J., Gabarra R., Riudavets J., Comas-Angelet J., Alomaro J., 2013. Taxonomic identification of *Macrolophus pygmaeus* and *Macrolophus melanotoma* based on morphometry and molecular markers. Bulletin of Entomological Research 103: 204-215.

**Informació extreta: Aplicacions de la biologia molecular en el control biològic de plagues.**

- CIPF. 2005. NIMF 5. Glosario de Términos Fitosanitarios. Normas Internacionales de Medidas Fitosanitarias. FAO, Roma.

***Informació extreta: Definició de plagues.***

- Córdoba E.M., Sastre F., Sánchez-Noriega A., González-Verdejo C.I., 2015. Guías de cultivo. Serie leguminosas: la alfalfa. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Junta de Andalucía, Córdoba, 18 pp.

***Informació extreta: Característiques i aprofitaments de l'alfals.***

- Dawei W., Limiao D., Jiangong N., Jiyue G., Hongfei Z., Zhongzhi H., 2019. Recognition pest by image-based transfer learning. Journal of the Science of Food and Agriculture 99(10), 4524-4531. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9689>

***Informació extreta: Antecedents sobre l'aplicació de tècniques moleculars.***

- Delgado I., Muñoz F., Andueza D., 2005. El cultivo de la alfalfa en Aragón. Recientes ensayos sobre variedades. Informaciones Técnicas del Departamento de Agricultura y Alimentación 175, Gobierno de Aragón, Zaragoza, 16 pp.

***Informació extreta: Característiques del cultiu d'alfals.***

- Desjardins P., Conklin D., 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualized Experiments 45, 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>

***Informació extreta: Discussió de resultats sobre la extracció i quantificació de l'ADN.***

- Franck P., Maalouly-Matar M., Olivares J., 2017. Molecular Tools for the detection and the identification of Hymenoptera parasitoids in Tortricid fruit pests. International Journal of Molecular Sciences 18, 2031; <https://doi.org/10.3390/ijms18102031>

***Informació extreta: Antecedents sobre l'aplicació de tècniques moleculars.***

- Hogg D.B., 1994. Know Your Friends: *Bathyplectes*, Parasites of the Alfalfa Weevil, Midwest Biological Control News Online. Vol. I(1). <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/mbcn102.html>

***Informació extreta: Antecedents sobre cicle de Bathyplectes ssp.***

- Juárez A., 2018. Mecanismes de detecció d'organismes genèticament modificats basats en àcids nucleics. El cas del panís BT. Treball Final de CFGS de Laboratori d'Anàlisi i Control de Qualitat. Lleida, 57 pp. No publicat.

***Informació extreta: Discussió de resultats sobre la extracció i quantificació de l'ADN.***

- Kuhar T.P., Youngman R.R., Laub C.A., Alfalfa Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Population Dynamics and Mortality Factors in Virginia. *Environmental Entomology* 29(6), 1295-1304.

***Informació extreta: Discussió de resultats sobre la cria d'H. postica.***

- Levi A., 2018. Ecology and control of the Alfalfa Weevil, *Hypera postica* Gyllenhal (Col. Curculionidae). Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal, Universitat de Lleida.

***Informació extreta: Antecedents sobre cicle de Bathyplectes ssp.***

- Lloveras J., Delgado I., Chocarro C., 2018. Preguntas sobre la alfalfa. SAT 3043 Ansó, Tauste, ISBN 9788409014477.

***Informació extreta: Generalitats sobre el cultiu de l'alfals.***

- MAPA, 2019. Avance del anuario de estadística 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, <https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2018-Avance/avance/AvAE18.pdf>

***Informació extreta: Estadístiques agràries del cultiu d'alfals.***

- Martín A., Núñez E., Rodríguez E., 2019. Guía de gestión integrada de plagas para el cultivo de la alfalfa. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

***Informació extreta: Plagues de l'alfals i el seu control.***

- Núñez E., Rodríguez E., Perdiguer A., 2008. Una estratègia para el control de plagas en la alfalfa. Informaciones técnicas. Dirección General de Alimentación Agraria. Gobierno de Aragón.

***Informació extreta: Plagues de l'alfals i el seu control.***

- Sereno E., 2016. La alfalfa española conquista el mundo: los Emiratos y China, principales destinos. <https://www.eleconomista.es/empresas-finanzas/agro/noticias/7649296/06/16/La-alfalfa-espanola-conquista-el-mundo-los-Emiratos-y-China-principales-destinos.html>

***Informació extreta: Importància econòmica de l'alfals.***

- Sopena A., 2019. Comunicació personal. Entrevista sobre el cultiu de l'alfals. En present document.

***Informació extreta: Importància econòmica de l'alfals, plagues que l'afecten, tractaments. Processament i comercialització de l'alfals.***

- Tuda M., Iwase S.-I., Kagoshima K., 2016. Mitochondrial sweep by Wolbachia and diversification in the invasive alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera,

Curculionidae), in its native range .

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX372667.1?report=genbank&log\\$=seqview](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX372667.1?report=genbank&log$=seqview)

***Informació extreta: Seqüència genètica de partida d'H. postica.***

- Ureta C., Elisa A., Ureta E., 2014. El control de plagas agrícolas: Pasado, presente y futuro. Ciencia 65(3), 78-86.

***Informació extreta: Història del control de plagues.***

- Velázquez P., Aragón C., Romero A., 2012. Extracción y purificación de ADN. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>

***Informació extreta: Tècniques d'identificació molecular.***

- Zahiri B., Fathipour Y., Khanjani M., Moharramipour S., Zalucki M.P, 2014. Alternatives to key factor analyses for assessing the population dynamics of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). Population Ecology 56, 185-194. <https://doi.org/10.1007/s10144-013-0402-5>

***Informació extreta: Discussió de resultats sobre la cria d'H. postica.***



## ANNEX

### Entrevista al Sr. Antonio Sopena – Enginyer Agrònom de NAFOSA (Esplús, Osca).

#### 1. Què es Nafosa, a què es dedica?

Nafosa és una indústria farratgera dedicada, principalment, a l'assecatge (deshidratació del forratge). Disposa de 5 plantes: 3 a la província d'Osca (Esplús, Montsó, Peralta d'Alcofea), 1 a Navarra i un altra a Bahia Blanca (Argentina).

Jo sóc responsable del servei tècnic i controlem els moments dels talls, supervisió dels nivells de plagues, decisió sobre tractaments fitosanitaris, fertilització, etc. A l'alfals es fan diferents talls, des de primers d'abril fins a primers de novembre. Quan es talla, està 2 o 3 dies al camp per assecar-se. Després es recull del camp i es porta a la planta. Arriba aquí amb un 30-35 % d'humitat.

Aquí, l'alfals es fa passar per un gran rodet cilíndric buit per on s'injecta aire calent procedent d'una caldera de biomassa, i es baixa la humitat fins al 12 %. D'aquí, l'alfals deshidratat s'empaca en una màquina d'alta compactació i es fan paques d'uns 400 kg. Alternativament, si l'alfals és de qualitat més baixa, es granula i es fan pellets.



**Figura 38. Entrevista amb l'Enginyer Agrònom Antonio Sopena, a la planta de NAFOSA a Montsó (Osca).**

#### 2. Quanta superfície de d'alfals gestiona la seva empresa?

A les 5 zones d'actuació que tenim, l'empresa gestiona una superfície d'unes 40.000 ha processant més de 400.000 tones de farratge que es deshidraten en les diferents plantes. Ara mateix estem a la planta de Montsó, des d'on deshidratem el farratge dels proveïdors que tenim des del riu Cinca fins a Sariñena. Des d'aquí gestionem unes 8.000 ha. La terra no és nostra, sinó que lloguem finques i nosaltres la sembrem i fem

totes les labors o, en altres casos, són els propietaris que fan tot i nosaltres els comprem l'alfals.

### **3. Quines plagues de l'alfals són les més importants a la zona del seu àmbit d'actuació (Cinca Mig i la Llitera)?**

Al primer tall tenim l'apion i la cuca verda, és a dir *Hypera postica*. Aquesta és la que més mals de cap ens dona, ja que no hi ha tractaments efectius i la població va augmentant any rere any. Jo recordo que fa uns anys no era un problema. Quan jo vaig començar a treballar a l'empresa era l'apion. Però des de fa uns 10 anys el gran problema es l'*H. postica*. Pot ser fa uns anys els ramats d'ovelles pasturaven més l'alfals durant l'hivern i es menjaven part de la població hivernant. Ara no hi ha tants ramats i la plaga no es controla tant.

També hi ha l'eruga negra, que es controla més fàcilment amb algun tractament fitosanitari. A més a més estan els pugons. Ara no tenim tants problemes, però fa uns anys tractàvem molt amb fitosanitaris i també eliminàvem els enemics naturals i els pugons es descontrolaven. Causaven molts danys per la gran quantitat de melasses que produïen, que arribava fins a embussar les talladores.

A los mesos d'agost i setembre tenim l'eruga verda (*Helicoverpa*). A la zona de Binèfar hi ha més problemes que no pas a la zona de Montsó.

És molt important no eliminar els enemics naturals, ja que aleshores les plagues es descontrolen.

### **4. La cuca verda de l'alfals és una plaga important en aquesta zona? Quina incidència té?**

Poden ser molt importants. Per exemple, estem parlant que, si ha infestació d'*H. postica*, en el primer tall, en cop de produir uns 2.000 kg/ha es pot arribar a collir uns 300 kg/ha. Això suposa una gran pèrdua d'ingressos.

### **5. Quins tractaments es fan per aquesta i altres plagues?**

Moltes vegades no són efectius. Per exemple, aquest any hi ha hagut camps en els que hem tractat i altres que no, i no hi ha hagut diferència en el resultat.

Els tractaments són amb piretroides que estan permesos, encara que cada vegada hi ha més limitació de productes per temes mediambientals i de persistències. Intentem fer les mínimes aplicacions. Moltes vegades avancem els talls i és el millor que podem

fer. Abans es tractava més i inclòs els pagesos volien que es fessin més tractaments, però això ha canviat molt.

**6. Què pensa vostè que podria ser les solucions vers les plagues per a una millora de la qualitat de l'alfals?**

Hauríem de tenir un millor control de les plagues. Per exemple, si hi ha pugons i fan melassa això fa baixar la qualitat i fins i tot el ramat no vol menjar aquest alfals. També, controlar millor els regs per a que no hi hagi un excés d'humitat que faci malbé la planta amb proliferació de fongs.

**7. Creu que el control integrat i biològic tindrà més importància en el futur en el control de les plagues de l'alfals?**

El control integrat és molt important. Penso que és la clau. S'ha de combinar diferents mesures, com avançar alguns talls i, sobre tot no eliminar els enemics naturals de les plagues. A vegades s'ha de ser una mica permissiu i assumir un certa quantitat de danys, però no tractar en el primer moment que veus que hi ha algun pugó o alguna cuca verda, per exemple.

**8. Com s'avalua la qualitat de l'alfals que uss arriba a la fàbrica?**

La qualitat es valora segons el color, que estigui lliure de males herbes, la quantitat de proteïna, la quantitat de fibra. També es mira que no tingui moltes flors (5-10 % de flors). És el que avaluem aquí. La qualitat pot variar segons el tall. Per exemple, els dos talls després de la sembra tenen més males herbes que no els següents. Després, quan l'alfals ja està ben establert, la qualitat és millor.

**9. Com es processa l'alfals a la deshidratadora?**

Aquí arriba l'alfals després que es recull en el camp. La màquina que el recull el trosseja en talls d'uns 10 cm. Arriba i es pesa, es mira la humitat i s'avalua la qualitat. Després, s'amuntega mentre passa a la planta deshidratadora, on s'asseca en un tròmel. Aquí s'asseca amb calor que fa una caldera de biomassa (closca d'ametlla, pinyol d'oliva)

**10. Quines sortides te l'alfals després de ser deshidratat? On es ven?**

Es ven a ramaders que tenen vaques, principalment. La major part de la producció s'exporta als Emirats Àrabs i a la Xina. Aquí abans havia més ramaders, però les

reduccions de vaques que ha anant imposant la Unió Europea ha fet que ens veiem obligats a vendre gran part de la producció a altres països.



**Figura 39. Bales d'alfals deshidratat en la planta de NAFOSA a Montsó (Osca).**